

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**



**PAPEL DE LAS CÉLULAS NATURAL KILLER  
EN LA LEUCEMIA INFANTIL  
EN SITUACIÓN DE IDENTIDAD HLA**

**Tesis doctoral presentada por:**

**Isabel Martínez Romera**

**Directores de la Tesis:**

**Dr. Antonio Pérez Martínez**

**Dr. Miguel Ángel Díaz Pérez**

**Madrid 2016**



**EL DR. MIGUEL ÁNGEL DÍAZ PÉREZ, JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE ONCO-HEMATOLOGÍA Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO DEL HOSPITAL INFANTIL UNIVERSITARIO NIÑO JESÚS DE MADRID Y EL DR. ANTONIO PÉREZ MARTÍNEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA UAM Y MÉDICO ADJUNTO DE ONCOHEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PAZ**

**C E R T I F I C A N:** Que Dña. **ISABEL MARTÍNEZ ROMERA**, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección un trabajo de investigación titulado ***“Papel de las células Natural Killer en la leucemia infantil en situación de identidad HLA”***, para optar al Grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

En Madrid, a 27 de Mayo de 2016

Fdo. Miguel Ángel Díaz Pérez

Fdo. Antonio Pérez Martínez

## AGRADECIMIENTOS

*A todas aquellas personas, que son muchas, que me han acompañado a lo largo de este camino, y que han contribuido con su ayuda a que este proyecto haya podido salir adelante.*

*En especial...*

*A mis directores de tesis, Antonio y Miguel Ángel, por su respaldo constante y su paciencia infinita. Por creerme capaz de llevar a cabo este trabajo y por transmitirme su enorme ilusión con el mismo.*

*A Lucía y a Jaime, por su inmensa ayuda, sin la cual esta tesis nunca hubiera podido realizarse.*

*A Charo Madero, por su crucial colaboración y su amabilidad constante.*

*A mi familia, por su apoyo incondicional y su enorme ayuda logística.*

*A Borja y a Guillermo, por hacerlo todo mucho más fácil.*

## ÍNDICE

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN   | 15 |
| 1. LEUCEMIA INFANTIL, TPH Y PAPEL DEL SISTEMA INMUNE  | 17 |
| 2. ORIGEN DE LAS CÉLULAS NK   | 18 |
| 3. ESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS NK   | 19 |
| 3.1 KIRs  |    |
| 3.2 CD94/NKG2D  |    |
| 3.3 CD94/NKG2A y CD94/NKG2C   |    |
| 3.4 Receptores de citotoxicidad natural   |    |
| 3.5 DNAM-1 (CD226)  |    |
| 3.6 CD96  |    |
| 3.7 CD69  |    |
| 3.8 CD16  |    |
| 3.9 CD25  |    |
| 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CÉLULAS NK  | 24 |
| 4.1 Vías de activación de la célula NK  |    |
| 5. MADURACION FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS NK   | 25 |
| 5.1 Educación de la célula NK   |    |
| 5.2 Plasticidad funcional de la célula NK   |    |
| 6. RECONOCIMIENTO DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS POR LAS CÉLULAS NK  | 29 |
| 6.1 Posibles mecanismos para potenciar este reconocimiento  |    |
| 7. USO TERAPEUTICO DE LAS CÉLULAS NK  | 31 |
| 7.1 Mecanismo para incrementar la actividad antitumoral de las células NK                                 |    |
| 7.2 Protocolos de inmunoterapia adoptiva con células NK   |    |
| 8. PAPEL DE LAS CÉLULAS NK EN EL TPH  | 32 |
| 8.1 Grado de identidad HLA  |    |
| 8.2 Tipo de leucemia  |    |
| 8.3 Presencia de linfocitos T en el periodo post-TPH  |    |
| 8.4 Como optimizar la actividad antileucemia de las células NK mediante una correcta selección de donante |    |
| II. HIPÓTESIS   | 37 |

|   |    |
|---|----|
| III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS  | 41 |
| 1. JUSTIFICACIÓN  | 43 |
| 2. OBJETIVOS  | 43 |
| IV. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS   | 45 |
| 1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS NK EN EL TPH HLA IDÉNTICO   | 47 |
| 1.1 Condiciones del estudio   |    |
| 1.2 Pacientes y enfermedad  |    |
| 1.3 Donantes  |    |
| 1.4 Obtención de datos clínicos y analíticos retrospectivos   |    |
| 1.5 Obtención de muestras biológicas  |    |
| 1.6 Obtención de DNA genómico de donantes y pacientes   |    |
| 1.7 Obtención del haplotipo KIR de donantes y pacientes   |    |
| 2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS NK EN LA LEUCEMIA AGUDA   | 55 |
| 2.1 Condiciones del estudio   |    |
| 2.2 Pacientes y enfermedad  |    |
| 2.3 Obtención de muestras de control  |    |
| 2.4 Obtención de datos clínicos y analíticos retrospectivos   |    |
| 2.5 Obtención de muestras biológicas  |    |
| 2.6 Fenotipado de las células NK del estudio mediante citometría de flujo   |    |
| 2.7 Expansión de las células NK de los pacientes  |    |
| 2.8 Obtención de DNA genómico de los pacientes  |    |
| 2.9 Obtención del haplotipo KIR de los pacientes  |    |
| 2.10 Estudio <i>in vitro</i> de la funcionalidad de las células NKAE de los pacientes<br>frente a la línea celular K562 y a los propios blastos |    |
| 3. PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS  | 59 |
| V. RESULTADOS   | 61 |
| 1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS NK EN EL TPH HLA IDENTICO   | 63 |
| 1.1 Probabilidad de recaída, exitus y SLE de forma global   |    |
| 1.2 Probabilidad de recaída en función del haplotipo del donante y paciente   |    |
| 1.3 Probabilidad de exitus en función del haplotipo del donante y paciente  |    |

|  |     |
|--|-----|
| 1.4 Probabilidad de la SLE en función del haplotipo del donante y paciente   |     |
| 1.5 Estudio de la asociación entre los genes KIR de donantes, pacientes y reconstitución inmune post-TPH con los eventos post-TPH                              |     |
| 1.6 Estudio de la asociación entre la presencia/ausencia de C1, C2 y Bw4 en el donante y sus correspondientes ligandos en el receptor con los eventos post-TPH |     |
| 1.7 Reconstitución inmune post-TPH   |     |
| 1.8 Asociación entre la reconstitución inmune de los receptores con los eventos post-TPH   |     |
| 2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS NK EN LA LEUCEMIA  | 74  |
| 2.1 Características fenotípicas de los pacientes   |     |
| 2.2 Características fenotípicas de los pacientes   |     |
| 3. EXPANSIÓN DE LA CÉLULAS NK Y FENOTIPO DE LAS NKAЕ   | 83  |
| 3.1 Dinámica de las expansiones  |     |
| 3.2 Celularidad de las expansiones   |     |
| 3.3 Fenotipo de las células NKAЕ   |     |
| 4. ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD   | 93  |
| 4.1 Resumen de todos los pacientes de forma global   |     |
| VI. DISCUSIÓN  | 95  |
| VII. CONCLUSIONES  | 111 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA   | 115 |
| IX. ANEXO  | 125 |

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1. Leucemia infantil y papel del sistema inmune

Hoy en día sabemos que la leucemia aguda (LA) infantil es una enfermedad con un origen genético. Conocemos, además, el importante papel que posee el sistema inmune tanto en el origen como en el control posterior de esta patología.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se propuso inicialmente como tratamiento en los pacientes que no respondían de forma adecuada a las terapias convencionales. La idea original era poder dar dosis mucho más elevadas de quimioterapia, algo no factible si no se poseían unos progenitores que permitieran rescatar posteriormente al paciente de la aplasia irreversible producida por esos fármacos a altas dosis. No obstante, posteriormente se fue descubriendo como el propio TPH en sí poseía un papel terapéutico, mediado por las células del inóculo en lo que se denomina efecto injerto contra leucemia (IcL), y a partir de ese momento se ha ido profundizando en el estudio de los distintos grupos celulares originados en la reconstitución inmune que intervienen de una manera u otra en el periodo post-TPH. Ello ha permitido plantear nuevos estudios que permitan optimizar la selección de donante y nuevas líneas de investigación con distintos tipos de inmunoterapia adoptiva en distintos momentos del TPH.

Desde el inicio del desarrollo del TPH, un requisito en la búsqueda de donante ha sido la búsqueda de identidad HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigen*). Este tipo de TPH HLA idéntico (*matched*) ha supuesto una revolución en el tratamiento de la leucemia aguda, ya que tiene una menor morbilidad en pacientes pediátricos que otros tipos de TPH. No obstante, la supervivencia global y libre de eventos se ve afectada en este tipo de trasplante por las infecciones y recaídas. Este hecho ha propiciado que se hayan ido incorporando al esquema del TPH el uso de distintas poblaciones de células del sistema inmune, estimuladas y modificadas en mayor o menor medida, como herramienta terapéutica complementaria (inmunoterapia adoptiva). En el momento actual se realizan, dentro de la práctica clínica en el TPH HLA idéntico, infusiones con linfocitos del donante (ILD), que teóricamente potencian el efecto IcL, pero que inevitablemente llevan unidos otros fenómenos no deseados, principalmente el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped (EICH). El uso de las células *Natural Killer* (NK) como inmunoterapia adoptiva ligada al TPH en estos pacientes podría constituir una herramienta complementaria de gran utilidad para disminuir la morbilidad, ya que poseen un efecto citotóxico antileucemia sin conllevar mayor riesgo de desarrollo de EICH.

El intento de potenciar la alorreactividad de las células NK en el escenario del TPH se ha abordado desde dos perspectivas, complementarias a su vez. La primera ha sido intentar optimizar la alorreactividad entre donante y receptor, incluso en situación de identidad HLA. Para ello se han propuesto y estudiado diversos modelos: ligando-ligando, receptor-receptor y receptor-ligando, siendo éste último el que se ha demostrado como más preciso. El segundo abordaje ha sido el estudio de los efectos de la infusión al receptor de células NK alogénicas en pacientes que reciben un TPH (durante el acondicionamiento o tras la infusión de progenitores) o incluso en pacientes no candidatos a recibir un TPH, tras un tratamiento similar al acondicionamiento de un TPH, pero menos intensivo<sup>1,2</sup>

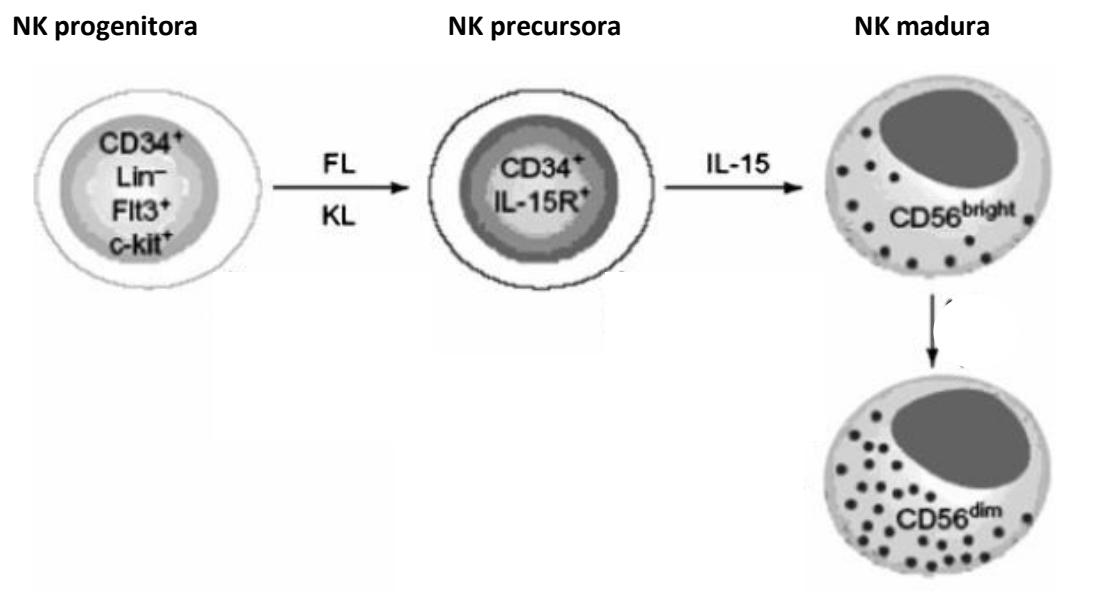
En conclusión podemos afirmar que las propiedades únicas de las células NK pueden abrir un nuevo escenario de inmunoterapia contra los tumores que son resistentes a las terapias actuales<sup>3</sup>. Su potencial uso terapéutico en la leucemia aguda resulta muy atractivo por la falta de resistencia cruzada con otros tratamientos y la mínima toxicidad que conlleva. A día de hoy, no obstante, existen todavía importantes limitaciones en la mayoría de estrategias terapéuticas en las que se han incluido, entre ellas la falta de especificidad y la pobre supervivencia *in vivo* tras su infusión<sup>4</sup>. Para un óptimo desarrollo e incorporación del papel de estas células a los distintos protocolos terapéuticos, en pacientes que reciben un TPH y en los que no lo hacen, es necesaria la aplicación de una estrategia multidisciplinar que incluya el perfeccionamiento de las técnicas de procesado y expansión de las células NK para mejorar su citotoxicidad y reducir la resistencia del tumor y la selección óptima de los donantes basándose en el tipaje KIR en el caso de los pacientes que reciben un TPH.

## 2. Origen de las células NK

Las células NK son células del sistema inmune innato. Derivan de progenitores en la médula ósea y, tras diferenciarse allí, migran a la sangre periférica, donde representan aproximadamente entre un 5 y 15% de los linfocitos.<sup>3</sup> Estas células actúan como primera línea de defensa frente a patógenos y células tumorales<sup>5,6</sup>, por lo que también se encuentran en los tejidos inflamados y órganos linfoides secundarios.

El proceso madurativo de las NK, que comienza en la médula ósea, ocurre en dos fases: en la inicial la célula NK progenitora responde a factores de crecimiento tempranos y evoluciona a una célula NK precursora (NKP) intermedia con el fenotipo básico CD34+ IL-15R+, que posteriormente finalizará su maduración. En la siguiente fase la Interleuquina (IL) 15, que es esencial para su homeostasis y desarrollo, induce el paso a células NK maduras. Éstas en sangre

periférica se dividen en dos subgrupos: las NK CD56 *bright* (10%) y NK CD56 *dim* (90%) en función de la densidad de ese receptor (CD56) en superficie. Las primeras son más proliferativas, producen mayores niveles de citoquinas y tienen una citotoxicidad natural más pobre. Las segundas derivan de las primeras, poseen mayor capacidad citotóxica y median la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (CCMA) a través del receptor CD16 (del cual poseen una alta expresión) sin activación de citoquinas, caracterizándose también por la ausencia de una respuesta proliferativa<sup>7</sup>. Hay un tipo de receptor, el NKG2A, que se expresa de forma temprana en la diferenciación de la célula NK y está expresado en la mayoría de células NK *bright*. En la diferenciación gradual de *bright* a *dim*, las células NK pierden de forma gradual este receptor y van ganando expresión de receptores KIR y otros marcadores de superficie. En situación de estabilidad, la expresión de KIR y NKG2A son complementarios a nivel celular y a nivel poblacional<sup>8</sup>. En este proceso de maduración intervienen muchos factores de transcripción y factores solubles y de membrana<sup>9,10</sup>.



**FIGURA 1.**

Desarrollo de la NK, dividido en tres etapas, según los modelos *in vitro*: En primer lugar una NK progenitora  $CD34^+$ , negativa para los marcadores específicos de linaje ( $Lin^-$ ) y con expresión de los receptores de tirosin-kinasas Flt-3 y c-Kit. EN segundo lugar se diferencia a una NK precursora  $CD34^+$  con expresión del receptor de IL-15, que en respuesta a dicha IL evoluciona finalmente a una NK madura *bright*, que posteriormente, en sangre periférica, dará lugar (no todas) la NK *dim*

### 3. Estructura de las células NK

La función y actividad de las células NK están reguladas por el resultado de la integración de las señales transmitidas por todos los receptores que estas células poseen en su superficie<sup>11,12</sup>

(Tabla 1). Estos receptores se pueden clasificar de diversas formas. La más utilizada es en función de la naturaleza de la señal transmitida, así tendríamos dos grandes grupos, los receptores activadores y los inhibidores. No obstante, el tipo de señal en algunos de ellos no va a ser de un solo tipo, y va a depender de distintos factores, como son el tipo y estado de la célula a la que se enfrente y el microambiente que rodea a ese encuentro. Así, tenemos receptores puramente inhibidores, otros puramente activadores y otros que van a poder actuar de una manera u otra. Otra manera de clasificar a los receptores es en función de su estructura.

| FUNCIÓN     | RECEPTOR        | LIGANDO                       |
|-------------|-----------------|-------------------------------|
| INHIBIDORES | KIR2DL1         | HLA C2                        |
|             | KIR2DL2/KIR2DL3 | HLA C1                        |
|             | KIR3DL1         | HLA Bw4                       |
|             | KIR3DL2         | HLA -A3, -A11                 |
|             | CD94/NKG2A      | HLA-E                         |
| ACTIVADORES | KIR2DS1         | HLA-C2                        |
|             | KIR2DS2         | HLA-C1                        |
|             | NKG2D           | MIC/A, MIC/B, ULBP 1-6        |
|             | DNAM-1          | CD155, CD112                  |
|             | CD94/NKG2C      | HLA-E                         |
|             | CD94/NKG2E      | HLA-E                         |
|             | NKp30           | B7-H6, BAT3                   |
|             | NKp44           | Hemaglutinina, Neuroaminidasa |
|             | NKp46           | Hemaglutinina, Neuroaminidasa |
|             | CD16            | Fc IgG (CCMA)                 |

**TABLA 1. Resumen de los receptores más relevantes de la célula NK**

### **3.1 Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs)<sup>13</sup>:**

Los genes para estos receptores, que se encuentran en el cromosoma 19, codifican glicoproteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Éstas se sitúan en una posición

transmembrana en la célula NK y van a tener como ligandos a moléculas HLA-I, desencadenando con dicha unión un estímulo inhibitor (lo más frecuente) o activador<sup>14</sup>. Todos los genes KIR son muy polimórficos, por lo que las distintas combinaciones en el número y polimorfismo alélico que pueden producirse en cada individuo dan como resultado una enorme diversidad<sup>15</sup>

Basándonos en la estructura del receptor, dentro de los KIRs podemos distinguir dos subfamilias en función del número de dominios extracelulares de la molécula. Se denominan KIR3D a los que contienen 3 dominios y KIR2D a los que contienen dos. Ambos grupos los podemos dividir a su vez en dos subgrupos en función de la longitud de su porción intracitoplasmática, y esta diferencia estructural es la que distingue (con alguna excepción) los KIRs inhibidores de los activadores. Así encontramos receptores con dominios citoplasmáticos largos (L) que serán los responsables de la transmisión de señales inhibitoras a través de la activación de una cascada de tirosinas, y receptores con dominios citoplasmáticos cortos (S) que potencialmente transmiten señales activadoras<sup>16</sup>.

Los ligandos en el caso de los KIRs inhibidores están ampliamente estudiados y definidos. Así, los KIR2D se unen de forma preferente a las moléculas HLA-C, uniéndose KIR2DL1 a HLA-C2 (con lisina en la posición 80) y KIR2DL2 y KIR2DL3 a HLA-C1 (con asparragina en la posición 80), los KIR3D se unen de forma preferente al HLA-B, siendo KIR3DL1 un receptor para HLA-Bw4, y KIR3DL2 un receptor para las moléculas HLA-A3 y HLA-A11<sup>17,18</sup>. En todos estos casos se transmite tras su unión una señal inhibitora. Los ligandos de los KIRs activadores no están completamente identificados, se ha visto que algunos de estos receptores tienen capacidad para unirse a los mismos ligandos de los KIR inhibidores pero con distinta afinidad (ej. 2DS1 con HLA C2). Se cree que otros ligandos podrían ser de distinta naturaleza (por ejemplo ciertos antígenos microbianos)

En función de la combinación del contenido individual de genes KIR<sup>15,19</sup> se han definido dos grandes haplotipos. Así tenemos el haplotipo A (genotipo AA), un haplotipo inhibitor, que se define por la presencia fija de ciertos genes: KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR2DS4 y sobre todo por la ausencia de los genes que conforman el haplotipo B (genotipo Bx), y que son: KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DS1. Por el contrario, el haplotipo B, activador, se define por la presencia de al menos uno de los genes descritos más arriba como definitorios de este haplotipo<sup>20</sup>.

### 3.2 CD94/NKG2D:

Se compone de una subunidad común con otros receptores (CD94) y una subunidad variable (NKG2D). Este receptor se expresa de forma constitutiva en células del sistema inmune innato

(células NK, los linfocitos T gamma/delta y macrófagos) y en células del sistema inmune adaptativo (Linfocitos T CD8). Estos receptores reconocen como ligandos a dos familias de moléculas de HLA-I, inusuales, que se codifican en el cromosoma 6<sup>21-23</sup>. Una se denomina MIC (del inglés *MHC class I-related chain*), e incluye a MICA y MICB. La otra familia se denomina ULBP (del inglés *UL-16 binding protein*) e incluye a ULBP 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Ambas familias son muy polimórficas, habiéndose descrito 54 alelos para MICA y 16 para MICB. Todos estos ligandos raramente se expresan en tejidos adultos sanos (se han descrito en ciertas células epiteliales), expresándose sin embargo en muchas líneas tumorales. La expresión de estos ligandos se induce en la célula en situaciones de estrés celular, infección o daño del DNA. La unión del receptor con dichas moléculas activa la citotoxicidad de la célula NK y aumenta la secreción de citoquinas proinflamatorias como el Interferón (IFN) gamma. Se ha constatado que hasta el 80% de las líneas tumorales humanas expresan de forma endógena múltiples ligandos para NKG2D.

### 3.3 CD94/NKG2A y CD94/NKG2C<sup>16</sup>:

El primero es inhibidor y el segundo activador. Ambos receptores tienen como ligando a HLA-E. La expresión de esta molécula de HLA en la superficie celular puede por tanto unirse a ambos receptores, sin embargo, parece que la señal inhibidora podría predominar sobre la activadora.

### 3.4 Receptores de citotoxicidad natural (NCRs)<sup>24</sup>:

Estos receptores se ha visto que trabajan “en equipo”, existiendo normalmente una expresión simultánea de ligandos para este grupo de receptores en la célula diana. Muchos de los ligandos de este grupo de receptores permanecen sin identificar, pero se piensa que todos ellos tienen en común la característica de que su expresión está inducida por estrés celular o condiciones patológicas. Se ha postulado que reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMP)<sup>21</sup>. Los principales receptores descritos dentro de este grupo son:

- **NKp30:** Este receptor se expresa en todas las células NK y también en los monocitos. Se han descrito como ligandos suyos a la molécula BAT-3 (*antigen-B-associated transcript*) y a B7-H6, un miembro de la familia de B7 que se expresa de forma exclusiva en células tumorales.
- **NKp44:** La expresión de este receptor está restringida a células NK activadas capaces de iniciar una respuesta citotóxica inmediata y a una pequeña subpoblación de linfocitos T gamma-delta +. La unión a sus ligandos induce a una liberación de gránulos citotóxicos, IFN-gamma y FNT-alfa, con un incremento muy importante en la capacidad de eliminar células de diversas líneas tumorales.

- **NKp46:** Este receptor se expresa en todas las células NK. Es un receptor activador y se sabe que su ligando o ligandos se expresan en las células tumorales.

### 3.5 DNAM-1 (CD 226):

Sus ligandos son CD155 (necl-5) y CD112 (PVRL2, nectin-2), que son moléculas que se ha visto que se encuentran con frecuencia sobreexpresadas en ciertas células tumorales. Se ha visto también que influye en la expresión de las mismas el daño en el DNA que ocurre de forma secundaria a la quimioterapia<sup>25</sup>. La unión del receptor a estos ligandos desencadena una potente citotoxicidad por parte de las células NK, habiéndose descrito un papel predominante en la activación con la unión a CD155, aunque la afinidad del receptor por ambos ligandos sea similar. Se ha visto que este receptor es muy importante para el control de la célula tumoral cuando los ligandos de otros receptores activadores como NKG2D se encuentran ausentes. De hecho, algunos experimentos han demostrado como existe cierta “jerarquía” entre los receptores de la célula NK, siendo NKG2D y CD16 los receptores activadores predominantes. Así, si los ligandos para NKG2D están presentes, CD226 puede jugar un papel secundario o coestimulador, sin embargo, cuando los ligandos para NKG2D están ausentes CD226 adopta un papel predominante y podría actuar sinérgicamente con otros receptores activadores como los NCR<sup>25</sup>.

### 3.6 CD96<sup>26</sup>:

Como ligandos se han identificado a CD155 (necl-5) y CD111 (nectin-1). Su unión con CD155 suprime la producción de IFN-gamma por parte de las células NK, teniendo así un papel opuesto al de CD226<sup>11,25</sup>.

### 3.7 CD69:

Este marcador de superficie se expresa en la célula NK poco después de su activación, y su papel en la citotoxicidad de esta célula se ha demostrado en humanos. También se ha visto que la coestimulación de este receptor juega un papel fisiológico, así como un aumento de la producción del factor de necrosis tumoral (FNT) alfa y un aumento de la expresión de otros marcadores de activación importantes como CD25 e ICAM-1<sup>27,28</sup>.

### 3.8 CD16<sup>29</sup>:

Se trata de un receptor activador expresado por las células NK (subtipo *dim*) tiene como ligando la fracción no variable de la IgG, lo que le permite participar en la CCMA.

### 3.9 CD25:

Se expresa en la superficie de la célula NK y en otras células hematopoyéticas cuando éstas son activadas por diferentes interleuquinas, como IL-2 e IL-12, promoviendo la respuesta de la célula NK y su adhesión a las células diana. El grado de su expresión nos indica de alguna manera el potencial proliferativo de esa célula NK<sup>28</sup>.

## 4. Mecanismo de acción de las célula NK

Las células NK no necesitan un reconocimiento específico de antígenos para llevar a cabo su función, ya que poseen en su superficie una serie de receptores activadores e inhibidores, y dependiendo de las señales que predominen una vez que se encuentra con la célula diana, podrá activarse, lo que conlleva la liberación de gránulos citotóxicos que contienen perforina, granzimas, y otras proteínas, a través de los cuales atacará a la célula diana produciendo la eliminación de la misma, o permanecer quiescente. Esta actividad de las células NK está regulada por múltiples citoquinas, incluyendo la IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21<sup>30</sup> y por múltiples interacciones célula a célula, incluyendo distintos tipos celulares como son las células dendríticas<sup>31,32</sup>, macrófagos y células del estroma mesenquimal.

Pero su función va más allá de la citotoxicidad directa. Se ha comprobado cómo la activación de estas células también produce la secreción por parte de las mismas de IFN gamma, factor de necrosis tumoral (FNT) y factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF) entre otros, que contribuyen a la respuesta inflamatoria y regulan en parte la intensidad y calidad de ciertas respuestas del sistema inmune adaptativo<sup>33</sup>.

### 4.1 Vías de activación de la célula NK:

- **Missing self phenomenon:**

El modelo postulado inicialmente y más estudiado a nivel experimental es el *missing-self phenomenon* o incompatibilidad HLA-KIR<sup>34</sup>. Este modelo postula que las NK son capaces de discriminar las células propias sanas de las células propias aberrantes (infectadas o con transformación tumoral) o de las células ajenas por la existencia de ciertos grupos de receptores clonales (KIR) en su superficie que reconocen las moléculas HLA-I presente en las células sanas del organismo<sup>12</sup>, reconocimiento que inactiva la función citotóxica de las NK. Para evitar la autoinmunidad, cada subclon de células NK expresa al menos un KIR inhibitor que reconoce una u otra molécula de HLA propio<sup>35</sup>. Por el contrario, un reconocimiento subóptimo de esas



moléculas de HLA-I o la ausencia del mismo desencadenaría la activación de la función citotóxica de las mismas<sup>12</sup>.

- ***Induced self phenomenon:***

Se ha descrito que el efecto citotóxico de las células NK también puede obtenerse a través de la interacción de ligandos tumorales de las células malignas, que son moléculas que se expresan en mayor número en células sometidas a un estrés celular y daño del DNA, con ciertos receptores activadores de las células NK, constituyendo ésta una vía diferente e independiente del HLA de ambos grupos celulares.

- ***Cytokine induced self phenomenon:***

En estudios recientes se pone en evidencia como la estimulación *in vitro* de las células NK de pacientes con diversas interleuquinas (IL-2, IL-12 e IL-15, IL-18, IL-21 e IFN tipo I) aumenta la proliferación y citotoxicidad de las mismas frente a sus propias células malignas. Se ha constatado que la IL-2 y la IL-15 inducen la expresión de receptores activadores en la superficie de las células NK a una intensidad capaz de prevalecer sobre la actividad de los receptores inhibidores activados por el reconocimiento del HLA.

- **CCMA:**

Por último, las células NK presentan un tipo de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Ciertos subgrupos de células NK (*dim*) expresan en su superficie niveles muy elevados de receptores Fc de baja afinidad (CD16) para IgG-1 e IgG-3. A través de ellos se unen a esa fracción Fc de anticuerpos unidos a su vez a células tumorales, lisando a estas últimas.

## **5. Maduración funcional de las células NK**

Hasta que la célula NK alcanza su estado de madurez con funcionalidad plena donde ocurre lo señalado, lleva a cabo un proceso de maduración con adquisición progresiva de propiedades y funciones. Es aquí donde concurren diversas teorías postuladas para explicar esa adquisición de funciones, existiendo varias explicaciones para este fenómeno, no excluyentes en ocasiones, y complementarias en varios casos.

### 5.1 Educación de las células NK:

A lo largo de las últimas dos décadas se han estudiado en profundidad los distintos mecanismos por los que la célula NK es capaz de adquirir la competencia necesaria para reconocer lo extraño y eliminar células infectadas o con transformación tumoral, tolerando por otro lado lo propio y evitando fenómenos de autoinmunidad<sup>5,12,36-38</sup>. Este proceso que determina el nivel de respuesta de cada célula NK se ha denominado de forma genérica “educación” o “licenciamiento”<sup>36</sup>. No obstante, éste último término denota de alguna manera que existe un mecanismo activo por el cual la célula adquiere su capacidad funcional. Sin embargo, el proceso por el que la célula NK se adapta al entorno, distinguiendo de forma selectiva las células a las que debe atacar y tolerando las células propias, podría ajustarse más a un proceso de inducción de hiporrespuesta frente a las propias células que de inducción de funcionalidad frente a las extrañas, por lo que en la bibliografía más reciente sobre el tema se prefiere evitar ese término genérico de “licenciamiento”. A nivel molecular, se han descrito algunos marcadores de superficie que permiten diferenciar a las células NK “educadas” de las que no lo están. Uno de ellos es el receptor DNAM-1<sup>37</sup>.

En los últimos años se han descrito modelos, no siempre excluyentes entre sí, que explican como esa célula NK se “educa” y es capaz de reconocer lo extraño y, sobre todo, de tolerar lo propio:

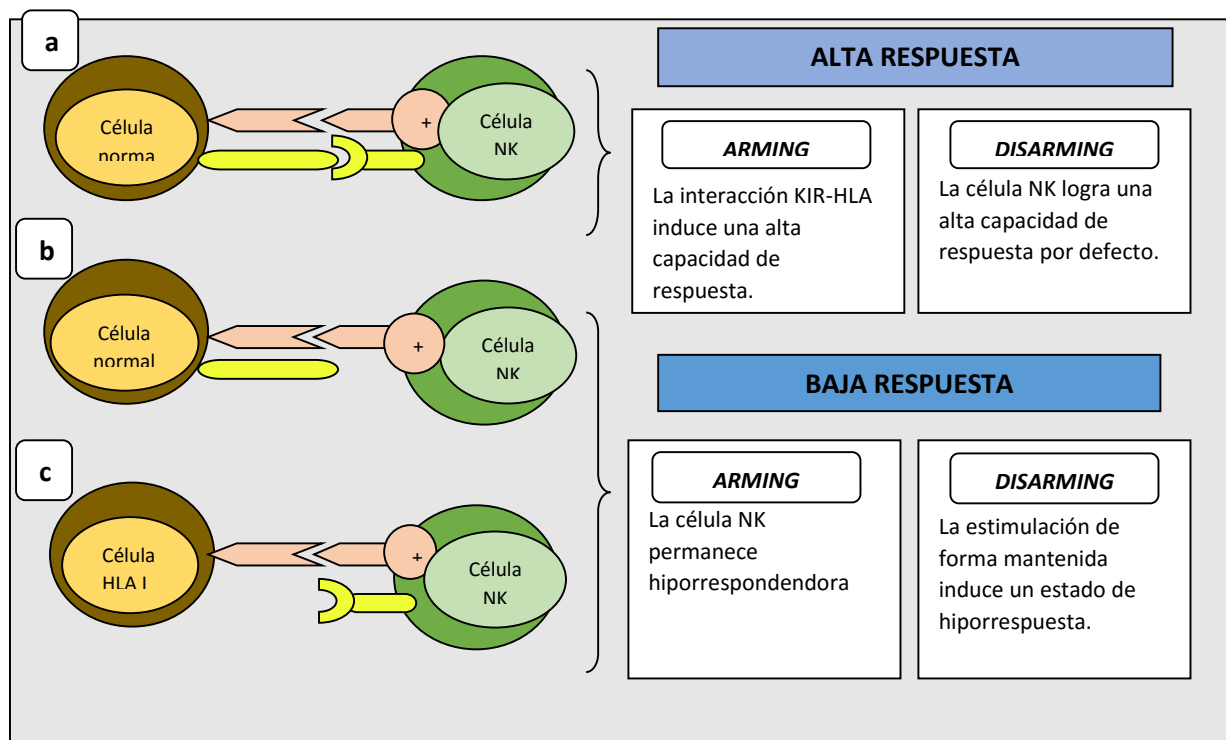
- ***Disarming model:***

Esta teoría defiende que todas las células NK, una vez han completado su desarrollo, tienen una alta capacidad de respuesta en situación basal. El encuentro de estas células con aquellas que carecen de ligandos para los receptores KIR inhibidores de la célula NK provocaría una situación en que ésta última sólo recibe señales activadoras. Ese estímulo activador mantenido a lo largo del tiempo produciría, por un mecanismo todavía no bien dilucidado, un daño en la transmisión de la señal activadora, y conduciría a un estado de hiporrespuesta, de forma similar a la situación de anergia que ocurre con los linfocitos T y B estimulados de forma crónica (Figura 2).

- ***Arming model:***

Este término de *arming* se ha utilizado de forma errónea pero frecuente en la literatura como sinónimo de educación o licenciamiento de la célula NK. Esta teoría sostiene que la célula NK se encuentra de forma basal en un estado inmaduro hiporrespondedor, y el encuentro de los receptores KIR inhibidores con sus respectivos ligandos (moléculas HLA-I) dota a la célula NK que los porta de una capacidad funcional completa (Figura 2).

Las objeciones que se han puesto a esta teoría son, en primer lugar, que ese estado basal de “inmadurez” que proponen no es compatible con el fenotipo de superficie que se ha encontrado en estudios de laboratorio en las células hiporrespondedoras tolerantes a lo propio. Por otro lado, no existe una explicación plausible basándonos en esta teoría para el hecho de que células NK con buena capacidad de respuesta puedan transformarse en células hiporrespondedoras al exponerse a un ambiente con déficit de HLA-I.



**FIGURA 2. Arming y Disarming Model**

La interacción entre células normales HLA-I (+) con sus respectivos receptores inhibidores en la célula NK (KIR) conllevan a una célula NK con alta capacidad de respuesta (a). La ausencia de las interacciones de HLA-I con sus correspondientes receptores inhibidores, por ausencia del receptor en la célula NK (b) o por ausencia de HLA-I en el ambiente (c) conllevan a una célula NK hiporrespondedora. Cada evolución se interpreta en función del *Arming* y *Disarming model* (derecha).

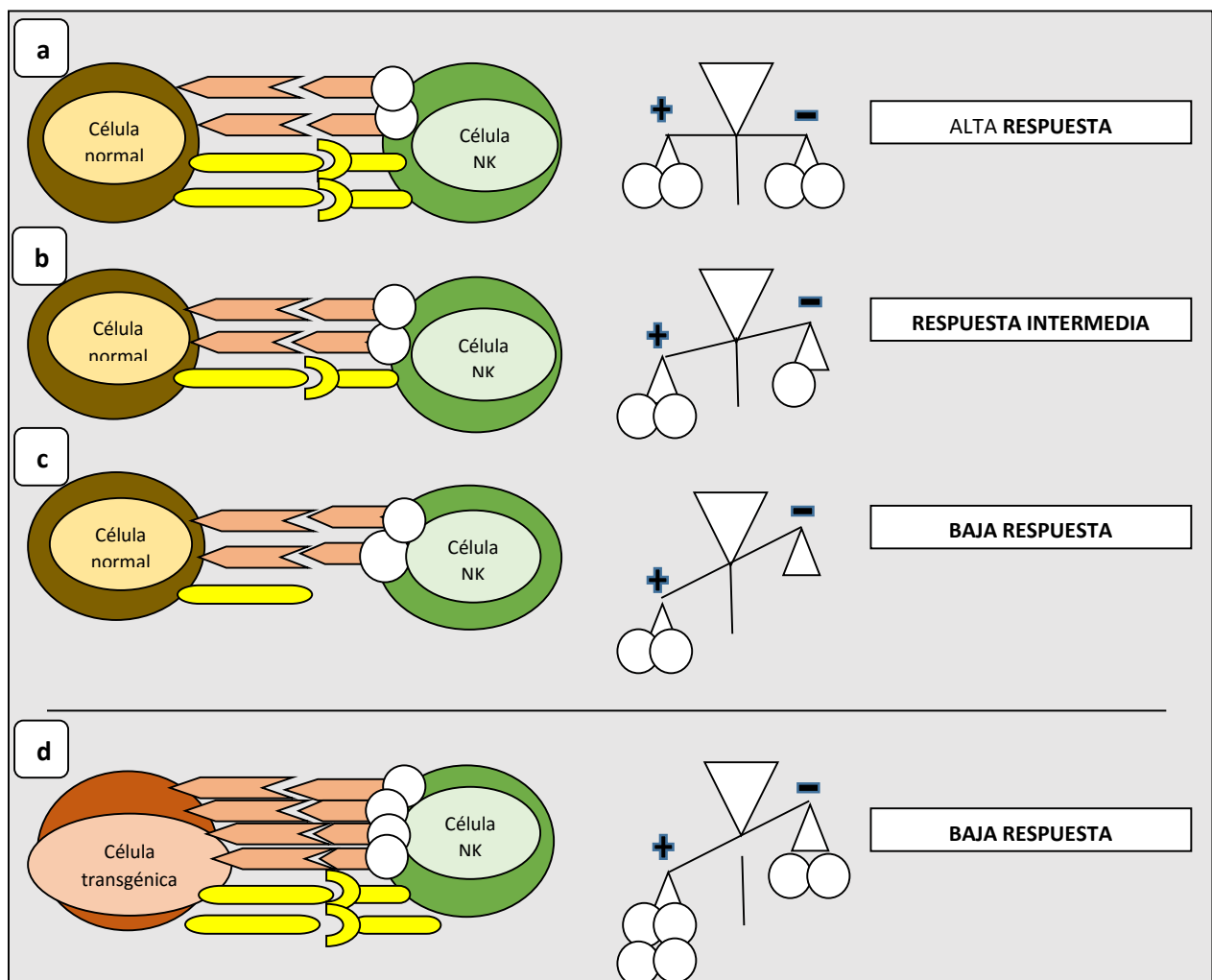
- **Rheostat model:**

Este modelo considera la respuesta de la célula NK desde un punto de vista cuantitativo. Lo que se propone en esta teoría es que la capacidad de respuesta de la célula NK varía cuantitativamente dependiendo de la cantidad de señales inhibitoras que recibe. Así, esta

capacidad disminuye conforme disminuye el número de receptores KIR inhibidores que posee la célula NK y con ello el número de señales inhibitoras que recibe.

- **Tunning model:**

Este modelo<sup>38</sup> incorpora las teorías de *Arming*, *Disarming* y *Rheostat*. Lo que se propone aquí es que, en función de la “red” de estímulos recibidos, del número y tipo de señales activadoras e inhibitoras integradas, cada célula NK adquiere un estado de respuesta cuantitativamente apropiado (Figura 3). Así, las células que reciben una “red fuerte”, con mayor cantidad de estímulos activadores que inhibidores conducen a un estado de respuesta más bajo (son más hiporrespondedoras), las células que reciben una “red débil”, con menor cantidad de estímulos activadores que inhibidores conducen a un estado de respuesta más alto y dentro de los dos extremos se encontrarían todo el abanico de posibilidades, con capacidades de respuesta más o menos intermedias en función de la “balanza” de estímulos recibidos en cada caso.



**FIGURA 3. *Tunning Model***

La capacidad de respuesta de la célula NK esta modulada de forma cuantitativa en función de la cantidad de estímulos inhibidores y activadores a los que está expuesta durante su desarrollo, partiendo del concepto de que cuantos más receptores inhibidores para el HLA-I propio presente, mayor capacidad de respuesta adquirirá.

**5.2 Plasticidad funcional de la célula NK**

La capacidad de respuesta de las células NK mantiene cierta plasticidad incluso después de haber alcanzado su madurez. Se piensa que esa capacidad de “resetear” su capacidad de respuesta representa un mecanismo para ajustar el umbral de activación de las células NK al nivel apropiado, según los distintos ambientes, preservando así una respuesta adecuada frente a células transformadas o infectadas y evitando por otro lado los fenómenos de autoinmunidad. Esa plasticidad funcional varía en función de la situación en la que se encuentra esa célula NK:

- **Cambios en la capacidad de respuesta de las células NK en situación de reposo:**

Se ha comprobado en estudios de laboratorio que la capacidad de respuesta de las células NK puede ser “ajustada” tras la transferencia de las células NK de un organismo a un ambiente con diferente HLA-I. De acuerdo con el *Tunning model*, las células NK en ese nuevo ambiente de HLA-I sufren un nuevo proceso de *tunning* que desemboca en una capacidad de respuesta apropiadamente alterada.

- **Cambios en la capacidad de respuesta de las células NK en condiciones de inflamación:**

Durante procesos de infección o de inflamación, el aumento de citoquinas que se produce en el ambiente conlleva a un mayor estado de respuesta en general, pudiendo incluso aquellos subclones hiporrespondedores adquirir una capacidad funcional prácticamente plena.

**6. Reconocimiento de las células leucémicas por las células NK**

Existe una diferencia en la cantidad y tipo de ligandos expresado en las los distintos tipos de células leucémicas para los receptores presentes en las células NK. Los descritos hasta la fecha incluyen la estirpe de la leucemia, la presencia de alteraciones citogenéticas y la edad del paciente. Todo ello hace que cada tipo de leucemia pueda expresar un mayor o menor grado de sensibilidad a la citotoxicidad mediada por las células NK, tanto a las autólogas del propio paciente, como a las alogénicas que surgen durante la reconstitución inmune después de un TPH o a las que se infunden de un donante sin haberle realizado al receptor un TPH previo. En el trabajo publicado por *Torelli et al*<sup>39</sup> realizan un estudio en una cohorte de pacientes con

leucemia linfoblástica aguda (LLA). Ellos encuentran en el grupo de los adultos con LLA diferencias en la intensidad de expresión de los ligandos de DNAM-1 (CD112 y CD155) y de NKG2D (MICA/B y ULBP 1-3) en función del subtipo de leucemia y de la presencia o no de ciertas alteraciones citogenéticas. Así, encuentran que los pacientes con la translocación BCR-ABL expresan mayores niveles de ULBP-1, ULBP-3 y MIC/B, mientras que los pacientes con LLA de estirpe B con MLL-AF4 y los de estirpe T expresan mayor cantidad sólo de ULBP-1. Sin embargo, en el grupo de pacientes pediátricos no encuentran diferencias en la densidad de expresión en función de la estirpe o de la presencia de estas alteraciones citogenéticas descritas. Infieren por tanto a partir de estos resultados que la susceptibilidad a la lisis por las células NK de los blastos de los pacientes pediátricos de su cohorte es similar en todos. Por otro lado, en otro estudio se ha visto que los blastos de las LLA pediátricas (no así en adultos) expresan una alta tasa de moléculas de adhesión como las de la familia de Beta 1 integrinas (CD 29, CD 49d), la familia beta-2 integrina (LFA-1) y la superfamilia de Ig (ICAM-1, LFA-3) <sup>35</sup>

Para poder trasladar eso a la práctica clínica y actuar en consecuencia a ello harían falta estudios con cohortes mucho más amplias y que incluyeran numerosos pacientes en cada uno de los subgrupos estratificados para poder estudiar así la influencia del linaje (B, T y cada uno de los subtipos dentro de estos dos grandes grupos) de las alteraciones citogenéticas y de biología molecular.

### 6.1 Posibles mecanismos para potenciar este reconocimiento:

Se han estudiado diversos mecanismos que potencialmente podrían potenciar ese reconocimiento. A continuación se describen los más importantes (Tabla 1 del ANEXO):

- **Estimulación de los blastos:**

Algunos estudios, como el realizado por *Jardine et al.* <sup>40,41</sup>, proponen la posibilidad de modular la expresión de ligandos de los blastos leucémicos, sensibilizándolos a la lisis mediada por las células NK. Esto podría ser especialmente útil en las LLA, que se ha visto son más resistentes en general que las mieloblásticas a la citotoxicidad mediada por estas células.

- **Activación de las células NK:**

Se puede incrementar el número y grado de activación de las células NK, tras un proceso de expansión *in vitro*, que conduce a un incremento en la expresión de ciertos receptores como DNAM-1 y NKG2D. Además la citotoxicidad de esas células NK expandidas y activadas se puede mejorar estimulándolas con citoquinas (IL-12 e IL-18) <sup>35</sup>.

## 7. Uso terapéutico de las células NK

La citotoxicidad de las células NK hacia las células tumorales fue objetivada por primera vez en experimentos *in vitro*, confirmándose posteriormente en diversos modelos murinos. En los últimos años, las líneas de investigación se han centrado sobre todo en las intervenciones que pueden potenciar ese efecto antitumoral, ya sea potenciando los receptores o modificando la expresión y reconocimiento de los ligandos expresados en las células tumorales que se unen a esos receptores y que determinan con dicha unión la actividad final de las células NK.

### 7.1 Mecanismos potenciales para incrementar la actividad antitumoral de las células NK:

- Modulación del balance entre receptores activadores e inhibidores en la célula NK mediante fármacos <sup>4,25,32</sup>
- Modificación genética del repertorio de receptores en la célula NK <sup>40,42,43,44</sup>.
- Sensibilización de las células malignas a la citotoxicidad mediada por las células NK mediante fármacos que regulen sus ligandos<sup>21</sup>
- Optimización de la interacción de las células NK con otras células del sistema inmune<sup>26,31</sup>

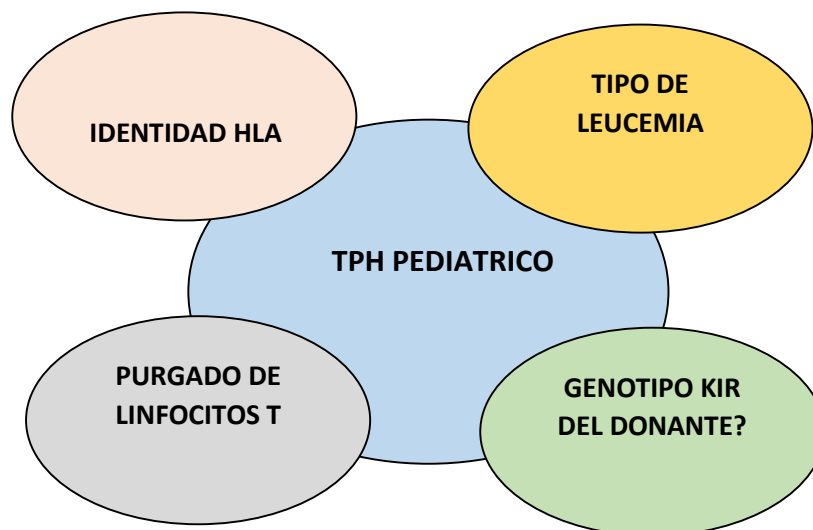
### 7.2 Protocolos de inmunoterapia adoptiva con células NK

Hasta la fecha se han ensayado diversos protocolos de inmunoterapia adoptiva con células NK. Dentro de los mismos hay ensayos que utilizan NK autólogas como complemento a tratamientos convencionales con quimioterapia en la leucemia aguda<sup>45</sup>, tras la expansión y activación de las mismas *in vitro*. No obstante este enfoque tiene una serie de limitaciones, como son la competitividad con los linfocitos del paciente por las citoquinas y el “espacio” físico donde expandirse, la inhibición de las NK autólogas por el propio HLA y la inmunosupresión crónica inducida por la leucemia. Se han publicado otros ensayos en los que se utilizan NK alogénicas<sup>46</sup> maduras. Estas pueden tener su origen en dos fuentes: de líneas celulares comerciales y de productos de linfoaféresis realizados a donantes sanos. Dentro de las células alogénicas de donantes sanos obtenidas por linfoaféresis tienen la ventaja de que se han “educado” en personas sanas, son completamente funcionales con gran potencial actividad antitumoral y habrá un mayor grado de disparidad KIR-HLA y con ello de la alorreactividad que con las autólogas. Los protocolos<sup>47</sup> para optimizar la correcta expansión y eficacia de las células NK infundidas no están claramente establecidos. Lo que si se ha objetivado es que para optimizar la citotoxicidad de las células NK alogénicas los factores clave son la combinación de los genes

KIR del donante y el HLA del receptor y donante<sup>18</sup>. Una precaución que hay tener en cuenta a la hora de expandir células NK es el fenómeno conocido como “senescencia replicativa”<sup>29</sup>, que postula que las células NK que han llevado a cabo un proceso de proliferación repetido *in vivo* o *in vitro* pueden sufrir un fenómeno de arresto del crecimiento, lo que les conduce a disminuir o perder su capacidad proliferativa, por lo tanto teóricamente tendrán mayor efecto antitumoral aquellas NK expandidas por periodos breves de tiempo (2-3 semanas) frente a aquellas que se han mantenido de forma prolongada en la expansión. La persistencia y expansión *in vivo* de células NK transferidas depende de la mayor o menor presencia de linfocitos y del incremento de la IL-15 endógena y de la IL-2.

### 8. Papel de las células NK en el TPH.

EL TPH en leucemias agudas pediátricas es un proceso muy heterogéneo<sup>48</sup> con muchas variables que influyen de forma concomitante en la evolución post-TPH, y que debemos intentar homogeneizar a la hora de comparar la influencia del genotipo y fenotipo de las células NK de los donantes<sup>8,14,17,20,48-66</sup>.



**FIGURA 4. Factores que influyen en la evolución del TPH.** En la evolución a corto, medio y largo plazo del TPH pediátrico influye el grado de identidad HLA entre donante y paciente, el tipo de leucemia (linfoblástica, mieloblástica) y la presencia o no de linfocitos T en el inóculo infundido al paciente. En último lugar se ha visto, aunque todavía no esté del todo establecido en qué sentido, que los genes KIR y el genotipo KIR del donante también influyen.



### 8.1 Grado de identidad HLA:

En el TPH HLA no idéntico fue donde inicialmente se describió el potencial papel de las células NK. EN el TPH haploidéntico las NK del donante tienen cuatro efectos<sup>1,7,57,63,64,67-70</sup> : 1) *Efecto antitumoral*:<sup>59</sup> mediado por el *missing-self phenomenon* ó incompatibilidad HLA-KIR<sup>14</sup>, el *induced-self phenomenon*, el *cytokine-induced-self phenomenon* y por último la CCMA. En cuanto a la duración de este efecto, se ha estudiado en diversas cohortes de pacientes la persistencia durante semanas de las NK alorreactivas que se encuentran en la reconstitución inmune inmediata post-TPH, disminuyendo con el paso de los meses, con desaparición prácticamente completa de estos clones al año del TPH<sup>1</sup>. 2) *Favorecer el injerto*<sup>71,72</sup>: Las células NK ejercen esta función a través de la disminución del número de linfocitos T del receptor y la supresión de respuestas alorreactivas por parte de los mismos. Está constatado en estudios experimentales que estos mecanismos se ven potenciados por la IL-15. 3) *Disminución de la incidencia de infecciones*: Las células infectadas generalmente expresan ciertos ligandos activadores y carecen o expresan de manera subóptima los ligandos inhibidores (HLA-I) para las células NK, con lo que tienen mayor susceptibilidad a ser eliminadas por estas últimas. Este fenómeno es muy importante en el control de las infecciones virales en el periodo temprano post-TPH, causantes de una morbilidad importante. Y 4) *Disminución de la enfermedad injerto contra huésped (EICH)*<sup>73</sup>: Los mecanismos que explican este fenómeno son múltiples. Por un lado, las células NK eliminan a las células presentadoras de antígenos del receptor (APCs) que actúan estimulando a los linfocitos T alorreactivos del donante. Por otro lado, las células NK ejercen una regulación de la población de linfocitos T del donante, a través de la disminución de linfocitos T alorreactivos (activados) por lisis directa y por competitividad por la IL-15 presente en el medio, que favorece la proliferación y activación de ambos grupos celulares. Se han descrito así mismo cambios cualitativos en la población de linfocitos T del donante, con un aumento de la proporción de linfocitos T reguladores frente a los linfocitos T CD4+ y CD8+ durante la reconstitución inmune post-TPH. Se postula que estos cambios se deben a las diferencias en la secreción de citoquinas por parte de las células NK y a la presencia de un mayor número de ligandos para receptores activadores de las mismas en esos grupos de linfocitos T (CD4 y CD8). Es importante señalar que esta función protectora frente al desarrollo de EICH por parte de las células NK disminuye drásticamente tras la primera semana post-TPH.

En TPH alogénico HLA idéntico, debido a que los genes que codifican los receptores KIR y las moléculas HLA se encuentran en cromosomas diferentes y se transmiten estocásticamente, teóricamente podrían darse casos de “alorreactividad” por el *missing-self phenomenon* en

situación de identidad HLA (TPH HLA idéntico y TPH autólogo) si ciertos receptores KIR no tienen ligando o existen moléculas HLA para las que no se expresa receptor inhibitorio KIR. Así, en situación de identidad HLA<sup>51,53</sup> se ha postulado que podría existir un beneficio debido a dos potenciales causas. Por un lado está cierta alorreactividad que se produciría por la activación de receptores KIR inhibidores que no reconocen el HLA de donante y receptor pero que habrían permanecido quiescentes en el donante. Estas células autorreactivas para el donante permanecerían hipofuncionantes en situación basal, pudiéndose activar teóricamente en el contexto de un medio rico en citoquinas proinflamatorias, como ocurre en aquellos pacientes que reciben un tratamiento quimioterápico, o con la administración exógena de citoquinas (por ej. IL-12, IL-18). Este fenómeno se ha estudiado en el trasplante autólogo en tumores sólidos en pacientes pediátricos<sup>74,75</sup> y en el trasplante alogénico HLA idéntico en hemopatías malignas en adultos, y aunque los resultados no son definitivos, parecen indicar que cuando este fenómeno se da en mayor medida, la incidencia de recaídas o progresión de la enfermedad tras un TPH autólogo o alogénico HLA idéntico son menores. No obstante, también existen trabajos en donde se ha comprobado como esas células NK con disparidad KIR-HLA no “educadas” son hipofuncionantes en todos los puntos de la reconstitución inmune post-TPH durante los primeros 6 meses<sup>8</sup>. Por otro lado, por el *induced-self phenomem*, un mayor número de receptores activadores y de expresión de ligandos para ellos en las células tumorales, podrían conferir mayor actividad a esas células NK frente al tumor en situación de identidad HLA<sup>76</sup>.

## 8.2 Tipo de leucemia:

Los dos grupos principales de leucemias agudas, las linfoblásticas y las mieloblásticas, expresan con un patrón distinto los ligandos para los receptores KIR. Una de las diferencias más llamativas se encuentra en la expresión de HLA de clase I, ya que las leucemias mieloblásticas expresan menos HLA de clase I que las linfoblásticas<sup>77</sup>. También está descrito en la literatura el hecho de que la mayor diferencia en la susceptibilidad a la lisis por células NK entre leucemias de estirpe mieloide y linfoide se da en los pacientes adultos, ya que las LLA de los adultos frecuentemente no expresan moléculas de adhesión que son esenciales para la unión y activación de la célula NK con la célula diana, sin embargo, los blastos de la LLA pediátrica, aun expresando un patrón distinto de ligandos, sí que expresan una alta tasa de moléculas de adhesión, como las de la familia de Beta1 integrinas y Beta2 integrinas, lo que favorece su lisis por parte de las células NK<sup>35</sup>.

### 8.3 Presencia de linfocitos T en el periodo temprano post-TPH:

El que en el periodo temprano post-TPH predomine un subtipo u otro de linfocitos va a depender de muchísimos factores, entre los cuales se hallan el tipo acondicionamiento, el origen de los progenitores que se infunde, el purgado o no de linfocitos T en el inóculo<sup>78</sup>, la posterior infusión de linfocitos del donante, el tipo de inmunosupresión post-TPH, y el genotipo KIR del donante. Los linfocitos T y las células NK son ambas células del sistema inmune, y en su expansión, proliferación y activación consumen de forma compartida recursos del medio donde se encuentran, principalmente la IL-15. Es por ello que en la recuperación inmune temprana post-TPH puede existir cierta relación inversa en cuanto al número de ambos grupos celulares, y ello puede modificar la evolución post-TPH, por la influencia distinta de ambos grupos celulares en el efecto injerto contra leucemia, control de infecciones, evolución del injerto y desarrollo de EICH.

### 8.4 Cómo optimizar la actividad antileucemia de las células NK mediante una correcta selección del donante<sup>30,71,79-83</sup>

Como se ha descrito con anterioridad, los genes para los receptores KIR y para el HLA se codifican en cromosomas diferentes e independientes. Así, se ha predicho que en los TPH HLA idénticos se objetiva una disparidad HLA-KIR de hasta el 75% en los TPH familiares y de casi un 100% en los no emparentados<sup>79</sup>. Pero el saber si a pesar de esa disparidad es posible el desarrollo de células NK alorreactivas procedentes del donante en el periodo post-TPH en este escenario de identidad HLA es una cuestión muy compleja en la que influyen muchísimos factores.

Hasta hace poco tiempo no se tenía en cuenta para la elección de donante el estudio de sus genes KIR y la valoración de la teórica alorreactividad con el HLA del receptor. En el TPH haploidéntico se ha comprobado como esa alorreactividad KIR-HLA entre donante y receptor mejora el efecto injerto contra leucemia y previene el desarrollo de EICH, por lo tanto sería clave incorporarlo en los estudios que se realizan de forma reglada durante la selección de donante<sup>1</sup>. Es muy importante señalar que los genes KIR son muy polimórficos (lo que determina la afinidad de unión a los HLA)<sup>4</sup>, y será muy importante hacer una valoración a nivel alélico de estos genes<sup>80</sup>. A lo largo de los últimos años se han ido proponiendo diversos modelos para intentar predecir el grado de alorreactividad KIR-HLA (Figura 5).

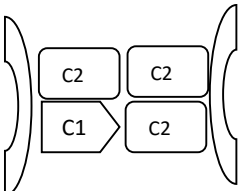
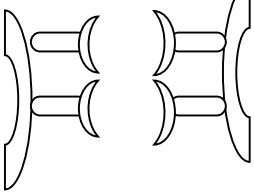
| MODELO<br><i>MISMATCH</i> | PRUEBA<br>SOLICITADA            | DEFINICION<br>MISMATCH   | EJEMPLO   | APLICABLE A<br>TPH<br>AUTOLOGO | APLICABLE A<br>TERAPIA CON<br>ANTICUERPOS |
|---------------------------|---------------------------------|--|---|--------------------------------|---|
| Ligando-<br>Ligando       | HLA de<br>Donante y<br>Receptor | Presencia de un<br>ligando en el<br>Donante con<br>ausencia del<br>mismo en el<br>Receptor |   | NO                             | NO  |
| Receptor-<br>Receptor     | KIR de<br>Donante y<br>Receptor | Presencia de un<br>KIR en el<br>Donante con<br>ausencia del<br>mismo en el<br>Receptor     |  | NO                             | NO  |

FIGURA 5. Modelos de *mismatch*

El primer modelo, el **Ligando-Ligando**, fue propuesto por el grupo de Perugia<sup>70</sup>. Aquí se necesita el tipaje HLA en donante y receptor, y se considera que existe *mismatch* si el ligando está presente en el donante pero ausente en el receptor. El segundo modelo, el **Receptor-Receptor**, fue propuesto por el grupo de Nantes<sup>81</sup>, e implica que se realice el tipaje KIR a donante y receptor. Aquí se considera que existe *mismatch* si un determinado receptor está presente en el donante pero ausente en el receptor. Debido al hecho de que los haplotipos B contienen más genes que los haplotipos A, generalmente la existencia de *mismatch* implica la presencia de un haplotipo B en el donante. El tercer modelo es el de **Receptor-Ligando**, propuesto por Leung et al<sup>35</sup>, que es aquel que estudia el repertorio de receptores KIR en los potenciales donantes y el tipaje HLA en el receptor para calcular el grado teórico de alorreactividad, así, cuanto mayor disparidad se encuentre entre receptores del donante y ligandos del receptor, mayor grado de alorreactividad se desencadenará teóricamente tras el TPH. Se ha comprobado que éste es el mejor modelo para predecir y optimizar la alorreactividad entre donante y receptor, siendo además válido cuando el análisis se realiza en receptores con leucemias linfoides<sup>35</sup>. Se ha visto además que este modelo es el único aplicable a los TPH autólogos y a la terapia con anticuerpos.

**HIPÓTESIS**

## HIPÓTESIS:

1. Las células NK en situación de identidad HLA poseen un efecto antileucemia a través de la interacción HLA-KIR (*missing self non licensed*) y de la interacción de receptores activadores con sus respectivos ligandos sobreexpresados en las células blásticas (*induced self*).
2. La expansión y activación de las células NK *in vitro* podría aumentar el efecto antileucemia mediado por receptores activadores y a través de factores solubles, independientes del reconocimiento receptor-ligando (*cytokine induced self*).
3. Existe una asociación entre el genotipo y fenotipo de las células NK de un donante HLA idéntico y la evolución de la leucemia de su huésped, pudiéndose identificar y definir estas variables genotípicas y fenotípicas como factores pronósticos de la evolución del TPH.
4. Existe una asociación entre el genotipo y fenotipo de las células NK de un paciente y la evolución de su leucemia, pudiéndose identificar y definir estas variables genotípicas y fenotípicas como nuevos biomarcadores.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 1. Justificación:

Las células NK, con su capacidad citotóxica y liberadora de citoquinas, poseen una potencial capacidad para controlar y eliminar las células leucémicas. La activación de las células NK está regulada por un equilibrio dinámico entre los receptores activadores e inhibidores y sus ligandos, y su actividad antitumoral y antiinfecciosa está mediada por los mecanismos de *missing-self*, *induced-self*, *cytokine induced-self* y CCMA.

La plataforma en la que inicialmente se ha explotado su capacidad antitumoral ha sido el TPH haploidéntico. Ahí se ha constatado como un mayor grado de disparidad HLA-KIR entre donante y receptor puede potenciar la actividad de estas células frente a las células leucémicas. No obstante, actualmente el tipo de TPH que se propone en primer lugar en las hemopatías malignas pediátricas que lo precisan es el que presenta identidad HLA entre donante y receptor. El conocimiento de la capacidad antitumoral de este subtipo de linfocito es este escenario de identidad HLA y los factores que influyen en ella, como son la variabilidad en los genes KIR y todos los procesos de interacción celular que modulan y otorgan plena capacidad funcional a estas células, podrían ayudarnos a optimizar la elección de donante en este tipo de TPH. Por otro lado, el estudio de las características genotípicas, fenotípicas y funcionales de estas células y su relación con la evolución de los pacientes con leucemia aguda en general (con y sin TPH) podría proporcionarnos nuevos biomarcadores.

### 2. Objetivos:

- 2.1 Estudiar la influencia del genotipo KIR del donante en el seno del TPH alogénico HLA idéntico en pacientes pediátricos con leucemias agudas.
- 2.2 Estudiar la influencia de los receptores KIR y sus ligandos en la evolución de los pacientes con leucemia aguda.
- 2.3 Valorar el impacto de la expansión NK en el fenotipo y la capacidad citotóxica de la célula NK de la leucemia aguda.



## **PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Para comprobar los objetivos señalados previamente se ha realizado un estudio de las propiedades y de la actividad antileucemia de las células NK en dos escenarios de identidad HLA. El primero es el de un TPH familiar HLA idéntico y el segundo es el de los pacientes con leucemia aguda. En ambos casos, teóricamente la disparidad HLA no tendría un papel en la activación y citotoxicidad de las células NK por el *missing self phenomenon*.

### 1. Estudio del papel de las células NK en el TPH HLA idéntico

#### 1.1 Condiciones del estudio

En esta parte del estudio se han incluido pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda que han recibido un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) familiar HLA idéntico en el Hospital Niño Jesús entre los años 2004-2014. En los casos en los que hubo que extraer de nuevo muestras biológicas (sangre periférica) se obtuvo el Consentimiento Informado (CI) de padres o tutores.

#### 1.2 Pacientes y enfermedad

- **Características de los pacientes (Tabla 2)**

Desde Junio de 2004 hasta Noviembre de 2014, 40 pacientes con diagnóstico de leucemia aguda (mieloblástica y linfoblástica) y crónica (mieloide) recibieron un TPH familiar idéntico con selección de progenitores hematopoyéticos CD34+ y acondicionamiento de intensidad reducida (basado en fludarabina) en la Unidad de Oncología, Hematología y Trasplante hematopoyético del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Los pacientes fueron 21 varones (52.5%) y 19 mujeres (47.5%) con una edad media en el momento del diagnóstico de 8.2 +/- 4.7 años, y una edad media en el momento del TPH de 9.7 +/- 4.8 años. El tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el TPH fue de 18.2 +/-19.6 meses. El diagnóstico en 21 pacientes (52.5%) fue leucemia linfoblástica aguda (LLA), el de 16 pacientes (40%) fue de leucemia mieloblástica aguda (LMA), el de 2 pacientes (5%) fue de leucemia mieloide crónica (LMC) y el de un paciente (2,5%) fue de síndrome mielodisplásico (SMD). Hay que señalar que en el posterior análisis de los datos los 2 pacientes con LMC y el paciente con SMD se incluyen en el grupo de pacientes con LMA por ser la evolución natural de estos cuadros sin un tratamiento específico. La situación de los pacientes previo al TPH fue de 21 pacientes (52.5%) en 1ª remisión completa (1ª RC), 15 pacientes (37.5%) en 2ª remisión completa (2ª RC), los 2 pacientes con LMC y un paciente con

LLA (7.5%) en 1ª RC morfológica pero no de biología molecular (translocación bcr-abl + en médula ósea en los 2 pacientes con LMC y translocación MLL + en el paciente con LLA) y el paciente con SMD (2.5%) con alteración citogenética (monosomía del cromosoma 7) .

- **Características genotípicas de los pacientes:**

Se ha realizado el análisis del genotipo KIR en 33 receptores. En 26 de ellos, el estudio se ha llevado a cabo mediante PCR multiplexada, determinándose en todos ellos los siguientes genes KIR: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5 ALL, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 2DL2, 3DL3 y 3DS1. En 24 de ellos se ha podido determinar además las variables alélicas 2DL5 a, 2DL5 b, 2DS4 *inv* y 2DS4 del. En los 7 receptores restantes en análisis se ha realizado mediante la técnica *Luminex*. Los genes KIR estudiados en estos casos han sido: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5 ALL, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 2DL2, 3DL3 y 3DS1 (Tabla 2 del ANEXO)

Por otro lado, se han recogido de las historias clínicas los datos del tipaje HLA-I de los pacientes. Se ha utilizado como referencia para la interpretación de los datos reflejados en las historias clínicas y su traducción a los valores de C1, C2 y Bw4 la fuente [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) . En algunos de los casos no se han encontrado un tipaje completo, recogándose igualmente esos datos. (Tabla 3 del ANEXO)

| Paciente | Sexo | Edad al Dx<br>(meses) | Patología | Tiempo<br>entre Dx<br>y TPH<br>(meses) | Tipo de RC<br>previo al<br>TPH | EICH<br>Agudo | EICH<br>Crónico | Recaída | Exitus | SLE<br>(meses) |
|----------|------|-----------------------|-----------|--|--------------------------------|---------------|-----------------|---------|--------|----------------|
| 1        | M    | 16 a 8 m              | LLA       | 5,6                                    | 1                              | Si            | No              | No      | No     | 11             |
| 2        | M    | 12 a 3 m              | LLA       | 68                                     | 2                              | No            | No              | No      | No     | 2,5            |
| 3        | F    | 18 a                  | LMA       | 3,3                                    | 1                              | No            | Si              | No      | No     | 16             |
| 4        | F    | 4 a 8 m               | LMA       | 4                                      | 1                              | No            | No              | No      | No     | 8              |
| 5        | F    | 13 a 7 m              | LLA       | 16                                     | 2                              | Si            | Si              | No      | No     | 46             |
| 6        | F    | 5 a 8 m               | LLA       | 40                                     | 2                              | Si            | Si              | Si      | Si     | 29             |
| 7        | M    | 6 a 3 m               | LMA       | 4,75                                   | 1                              | No            | No              | Si      | Si     | 3,5            |
| 8        | F    | 12 a 8 m              | LMA       | 4                                      | 1                              | No            | No              | No      | No     | 50             |
| 9        | M    | 8 a                   | LLA       | 40                                     | 2                              | Si            | Si              | No      | No     | 29             |
| 10       | M    | 9 a 3 m               | LLA       | 75                                     | 2                              | Si            | Si              | No      | No     | 40             |
| 11       | M    | 3 m                   | LLA       | 8                                      | 1                              | No            | No              | No      | No     | 84             |
| 12       | M    | 5 a                   | LLA       | 43                                     | 2                              | No            | No              | Si      | No     | 12             |
| 13       | M    | 2 m                   | LMA       | 4                                      | 1                              | No            | No              | Si      | Si     | 2,5            |
| 14       | M    | 12 a 11 m             | LMA       | 4                                      | 1                              | No            | No              | No      | No     | 24             |
| 15       | M    | 9 a 2 m               | LMA       | 4,75                                   | 1                              | No            | No              | No      | No     | 108            |
| 16       | F    | 7 a 9 m               | LMA       | 4                                      | 1                              | Si            | Si              | No      | No     | 84             |
| 17       | M    | 3 a 4 m               | LLA       | 42                                     | 2                              | No            | No              | Si      | Si     | 18             |
| 18       | M    | 8 a 11 m              | LLA       | 54                                     | 2                              | Si            | No              | No      | Si     | 2,5            |
| 19       | M    | 9 a 4 m               | LMA       | 6                                      | 1                              | No            | No              | No      | No     | 74             |
| 20       | F    | 3 m                   | LLA       | 3,3                                    | 3                              | No            | No              | No      | No     | 0              |
| 21       | M    | 7 a 5 m               | LMA       | 16                                     | 1                              | No            | No              | No      | No     | 60             |
| 22       | F    | 8 a 11 m              | LLA       | 8                                      | 1                              | Si            | No              | No      | No     | 37             |
| 23       | F    | 4 a 1 m               | LLA       | 6                                      | 1                              | No            | No              | No      | No     | 109            |
| 24       | F    | 10 a 5 m              | LMA       | 6                                      | 1                              | Si            | Si              | No      | No     | 70             |
| 25       | F    | 13 a 1 m              | LLA       | 14                                     | 2                              | No            | No              | No      | Si     | 1              |

|    |   |           |     |      |   |    |    |    |    |     |
|----|---|-----------|-----|------|---|----|----|----|----|-----|
| 26 | M | 11 a 11 m | LLA | 5,3  | 1 | Si | No | Si | No | 19  |
| 27 | F | 1 a 8 m   | LMA | 5,3  | 1 | No | No | No | No | 96  |
| 28 | F | 6 a 3 m   | LLA | 26,5 | 2 | No | Si | No | No | 15  |
| 29 | M | 12 a 10 m | LMA | 4,5  | 1 | Si | Si | No | No | 72  |
| 30 | M | 6 a 3 m   | LMA | 42   | 2 | No | No | No | No | 55  |
| 31 | M | 11 a      | LMA | 6    | 3 | No | No | No | No | 49  |
| 32 | M | 13 a 8 m  | LLA | 15   | 2 | Si | No | Si | Si | 4   |
| 33 | M | 14 a 7 m  | LMA | 21   | 2 | Si | Si | Si | No | 40  |
| 34 | M | 6 a 4 m   | LMA | 6,5  | 1 | No | Si | No | No | 120 |
| 35 | M | 3 a 2 m   | LLA | 43   | 2 | Si | No | No | No | 22  |
| 36 | F | 3 a 4 m   | LLA | 44   | 2 | Si | Si | No | No | 108 |
| 37 | M | 11 a 6 m  | LMA | 4,3  | 1 | No | No | No | No | 72  |
| 38 | F | 5 a 5 m   | LLA | 7    | 1 | Si | Si | No | No | 88  |
| 39 | F | 6 a       | LMA | 5,5  | 1 | No | No | No | No | 36  |
| 40 | F | 3 a 2 m   | LLA | 10   | 1 | Si | Si | No | No | 113 |

TABLA 2. Características de los pacientes trasplantados

### 1.3 Donantes

- **Características generales de los donantes**

Todos los donantes fueron emparentados. De ellos, 37 (92.5%) fueron hermanos y 3 (7.5%) progenitores. En relación a la identidad HLA 34 (85%) fueron HLA idénticos 12/12 y 6 (15%) fueron HLA idénticos 11/12. En cuanto al sexo 23 (57.5%) fueron hombres y 17 (42.5%) fueron mujeres. Analizando la disparidad o no de sexo entre cada pareja de donante-paciente, se ha objetivado que en 20 parejas (50%) el sexo de donante y receptor coinciden: en 12 (30% del total) ambos son varones y en 8 (20% del total) ambos son mujeres. En las otras 20 parejas (50%) donante y receptor son de distinto sexo, siendo 11 parejas (27.5%) el donante varón y el paciente mujer y en 9 parejas (22.5%) el donante mujer y el paciente varón. La edad media de los donantes en el momento del TPH fue de 14.4 +/- 10.4 años.

- **Características genotípicas de los donantes**

Se ha realizado el análisis del genotipo KIR en los 40 donantes. En 33 de ellos, el estudio se ha llevado a cabo mediante PCR multiplexada, determinándose en todos ellos los siguientes genes KIR: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5 ALL, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 2DL2, 3DL3 y 3DS1. En 31 de ellos se ha podido determinar además las variables alélicas 2DL5 a y 2DL5 b, y en 30 de ellos las variables alélicas 2DS4 *inv* y 2DS4 *del*. En los 7 donantes restantes en análisis se ha realizado mediante la técnica *Luminex*. Los genes KIR estudiados en estos casos han sido: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5 ALL, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 2DL2, 3DL3 y 3DS1. (Tabla 4 del ANEXO).

Por otro lado, se han recogido de las historias clínicas los datos del tipaje HLA de los donantes. Se ha utilizado como referencia para la interpretación de los datos reflejados en las historias clínicas y su traducción a los valores de C1, C2 y Bw4 la página [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk). En algunos de los casos no se han encontrado un tipaje completo, recogiendo igualmente esos datos. (Tabla 5 del ANEXO).

#### 1.4 Obtención de datos clínicos y analíticos retrospectivos

Mediante revisión de las Historias Clínicas se obtuvieron los siguientes datos:

##### 1.4.1 Clínicos

- *Pacientes*: sexo, fecha de nacimiento, presencia de síndrome de Down, tipo de patología, fecha del diagnóstico, tiempo en alcanzar primera remisión completa, tipaje HLA, fecha del TPH, número de TPH, tipo de remisión completa en el momento del TPH, número de infusiones de linfocitos del (DLI) y fechas de las mismas, desarrollo o no de enfermedad injerto contra huésped, fecha y grado, presencia o no de recaída, tipo y fecha, presencia o no de exitus, causa y fecha y tiempo de seguimiento.
- *Donantes*: sexo, fecha de nacimiento, tipaje HLA

##### 1.4.2 Analíticos

- Número de células CD34+ infundidas, número de células CD3+ infundidas.
- Número de células NK, linfocitos T (LT), LTCD4, LTCD8 y linfocitos B (LB) en los días +30, +60, +90, +120, +365 y + 730 desde el TPH.
- Genes KIR (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1) y haplotipo KIR (A o B) de pacientes y donantes.

### 1.5 Obtención de muestras biológicas:

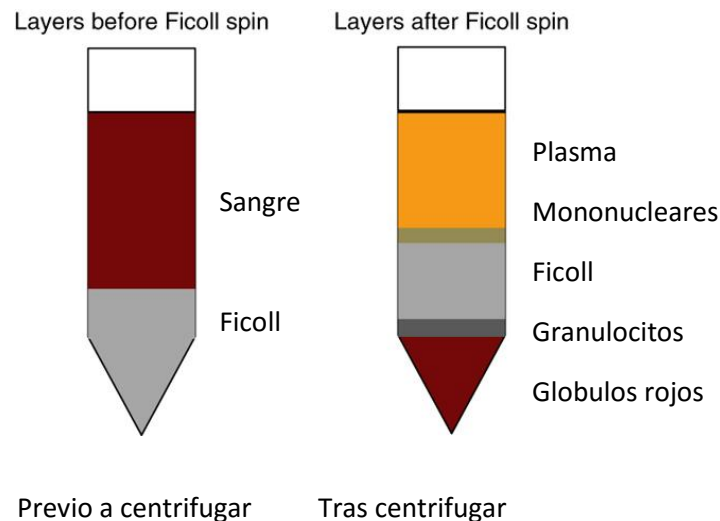
Las muestras biológicas para el análisis de los genes KIR se obtuvieron de:

- DNA genómico extraído de mononucleares de sangre periférica de donantes y pacientes, utilizado para el tipaje HLA previo a la realización del TPH, y almacenado en el Centro de Transfusiones de la Comunidad Autónoma de Madrid.
- DNA genómico extraído de sangre periférica de los donantes en el momento de la realización del presente estudio. Esta alternativa se llevó a cabo en aquellas parejas de paciente-donante de las que no había DNA genómico almacenado. En estos casos sólo se realizó la extracción de sangre periférica y posterior extracción de DNA a los donantes, ya que no era posible la obtención de DNA del propio paciente en mononucleares de sangre periférica en los pacientes trasplantados con quimera completa.

### 1.6 Obtención de DNA genómico de donantes y pacientes

A) Obtención de mononucleares a partir de sangre periférica con separación de gradiente a través de la técnica con *ficoll* (Figura 6). Ésta sirve para separar Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de otras células de la sangre por gradiente de densidad. Esta técnica se basa en que las células mononucleares son menos densas que los granulocitos y eritrocitos. Durante la centrifugación se van formando varias capas, el sedimento que está formado principalmente por granulocitos y eritrocitos ha migrado a través de la gradiente de densidad que es mayor que el del *ficoll*, encima estaría otra capa que sería el *ficoll* que es menos denso, y encima estaría otra capa fina opalescente que serían las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), finalmente sobre esa capa estaría las plaquetas y el plasma. Los pasos para realizarla son:

- 1- Se diluye la sangre periférica con un medio líquido de cultivo celular
- 2- Se añade la mezcla anterior a un tubo Falcon con 10 ml de *Ficoll*
- 3- Se procede a centrifugación a 17°C durante 20 minutos a 2000 rpm
- 4- Se extrae el anillo de células mononucleares con una pipeta Pasteur y se resuspende en PBS para realizar lavados posteriores (habitualmente 2)



**FIGURA 6. Técnica de separación de mononucleares con *Ficoll***

B) Obtención de DNA genómico de los mononucleares de sangre periférica mediante el kit QIAmp DNA Mini Kit de Qiagen®. Los pasos para realizar esta técnica son:

- 1- Se pipetea 20 mcL de Proteasa QIAGEN en el fondo de un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.
- 2- Se le añaden 200 mcL de la muestra a dicho tubo (si la muestra es menor de 200 mcL se añadirá PBS hasta completar dicho volumen).
- 3- Se añaden 200 mcL de Buffer AL (suministrado en el kit) a la muestra. Se vortea durante 15 segundos.
- 4- Se incuba a 56°C durante 10 minutos.
- 5- Se centrifuga brevemente a 7000 rpm.
- 6- Se añaden 200 mcL de etanol (96-100%) a la muestra, y se vortea durante 15 segundos.
- 7- Se centrifuga brevemente a 7000 rpm.
- 8- Se traspasa esta mezcla a una Columna mini Spin (suministrada en el kit), que a su vez se coloca en un tubo de 2 mL. Se cierra y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto. Tras eso se traspasa la columna a un nuevo tubo limpio de 2 ml.
- 9- Se abre la Columna Mini Spin y se añaden 500 mcL de Buffer AW1, se cierra y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto. Tras eso se traspasa la columna a un nuevo tubo limpio de 2 ml.
- 10- Se abre la Columna Mini Spin y se añaden 500 mcL de Buffer AW2. Se cierra y se centrifuga a 14.000 rpm durante 3 minutos.



- 11- Se coloca la Columna Mini Spin en un nuevo tubo de 1,5 ml. Se abre la Columna Mini Spin y se añaden 100 µl de agua destilada o Buffer AE. Se incuba a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto y posteriormente se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto.

### 1.7 Obtención del haplotipo KIR de donantes y pacientes

A partir del DNA genómico obtenido se realizó en análisis de los genes KIR mediante 2 técnicas:

- A) El *KIR typing kit* (Miltenyi). Realizado en 33 parejas paciente-donante. A partir del DNA genómico obtenido se realizó en análisis de los genes KIR mediante el kit *Kir typing kit*® (Miltenyi). Este kit permite la detección de los genes de los receptores KIR a nivel de DNA genómico o RNAm. La presencia o ausencia de estos genes es analizada mediante técnica de PCR utilizando *primers* específicos de secuencia (SSPs). Estos SSPs permiten la detección de 15 genes KIR humanos y 2 pseudogenes. Cada reacción de PCR contiene un control interno, generado por un segundo par de *primers*. Los pasos para realizar esta técnica son:

- 1- Aislamiento de DNA. En nuestro caso se realizó con el kit QIAmp DNA Mini Kit de Qiagen®. El DNA genómico obtenido en nuestro caso debe de tener una concentración de 75-125 ng/µl.
- 2- En cada kit para KIR typing, que contiene 22 pocillos, se añaden 25 µl de DNA genómico (muestra) y se realiza el termociclado, que consiste en:
  - a. Paso 1: 1 ciclo de 60 segundos a 95°C
  - b. Paso 2 (se describe aquí el específico para DNA genómico): 28 ciclos consistentes cada uno de ellos en: 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 63°C y 90 segundos a 72°C.
- 3- PCR y electroforesis en un gel de agarosa. Se administran 25 µl por pocillo dentro del gel.
- 4- Interpretación de la PCR:
  - a. Pocillos 1-19: contienen *primers* específicos para KIR más un control positivo de los *primers*. En consecuencia, 2 fragmentos de PCR pueden ser amplificados
  - b. Pocillo 20: es el control para contaminación en los casos en los que se utiliza c-DNA. Tan solo si existe contaminación se amplificará una banda de 260 pb.

- c. Pocillo 21: es el control positivo de la reacción de PCR. Solo los *primers* específicos de control generaran una banda de 400 pb.
- d. Pocillo 22 sirve como control negativo (aquí no hay que añadir muestra de DNA).

B) Mediante *Luminex*. Realizado en 7 parejas paciente-donante. Mediante esta técnica se determinan los 15 genes KIR y los 2 pseudogenes. Los pasos para realizar esta técnica son:

- 1- Aislamiento de DNA genómico, dejando una concentración final del mismo de 10 – 50 ng/mcl.
- 2- Amplificación de DNA mediante técnica de PCR y termociclado.
- 3- Hibridación con el “buffer” que contiene las esferas (LIFECODES Probe Mix®)
- 4- Analizar las muestras con la herramienta LUMINEX®

## **2. Estudio del papel de las células NK en la leucemia aguda**

### **2.1 Condiciones del estudio**

Han participado pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia aguda de “novo” o recaída en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús y en el Hospital Universitario La Paz. Se han reclutado 22 pacientes pediátricos (0-14 años) con diagnóstico (de “novo” o recaída) de leucemia aguda. Los tutores legales y los pacientes han sido informados verbalmente y por escrito del proyecto, recibiendo un documento de Consentimiento Informado (CI) aprobado por el Comité de Ética del Hospital NI/ Hospital La Paz.

### **2.2 Pacientes y enfermedad (Tabla 3)**

Desde Mayo de 2012 hasta Julio de 2014 se reclutaron 23 pacientes pediátricos que fueron diagnosticados de leucemia aguda (mieloblástica o linfoblástica) de “novo” o en recaída/refractoriedad en la Unidad de Oncología y Hematología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús y en la Unidad de Oncología y Hematología del Hospital La Paz.

Los pacientes fueron 13 varones (56.5%) y 10 mujeres (43.5%) con edades en el momento del diagnóstico comprendidas entre los 7 meses y los 15 años y 2 meses, con una media de 5,6 +/- 4,75 años y una mediana de 3,67 años.

| Paciente | Sexo | Edad al Dx<br>(meses) | Patología | Inmunofenotipo | Cariotipo                                      | Biología<br>Molecular                      | Exitus |
|----------|------|-----------------------|-----------|----------------|--|--|--------|
| 1        | M    | 14 a 1 m              | LLA       | T              |  |  | No     |
| 2        | F    | 4 a 5 m               | LLA       | B COMUN        |  | TEL/AML +                                  | No     |
| 3        | M    | 3 a 8 m               | LLA       | B COMUN        | 49 (21+, 22+, X+).                             | TEL/AML +                                  | No     |
| 4        | M    | 15 a 2 m              | LMA       | M4-M5          |  |  | Si     |
| 5        | F    | 5 a 6 m               | LLA       | B COMUN        |  |  | Si     |
| 6        | F    | 8 a 3 m               | LMA       | M1             |  |  | No     |
| 7        | M    | 4 a 8 m               | LMA       | M5             |  | WT1,<br>MLL/AF10<br>t(10;11)<br>(p11 q23)  | No     |
| 8        | F    | 2 a 6 m               | LMA       | M5             | 46XX<br>t(11;19)(q23;p13)                      |  | Si     |
| 9        | M    | 14 a 6 m              | LLA       | B COMUN        |  | BCR-ABL +                                  | Si     |
| 10       | M    | 5 a                   | LLA       | T              |  |  | No     |
| 11       | M    | 3 a 8 m               | LLA       | B COMUN        |  | TEL/AML +                                  | Si     |
| 12       | M    | 4 a 7 m               | LLA       | B COMUN        |  | TEL/AML +                                  | Si     |
| 13       | F    | 6 a 1m                | LLA       | B COMUN        |  |  | Si     |
| 14       | F    | 7 a 6 m               | LLA       | B COMUN        | 47 XY  |  | No     |
| 15       | M    | 8 a 7 m               | LLA       | B COMUN        |  |  | No     |
| 16       | F    | 14 a 5 m              | LLA       | PRO B          |  | MLL -AF4 +                                 | No     |
| 17       | M    | 10 a 7 m              | LLA       | B COMUN        |  | t(9;22),<br>reord TCR<br>gamma, del<br>p16 | No     |
| 18       | F    | 3 a 7 m               | LLA       | B COMUN        |  |  | No     |
| 19       | F    | 6 m                   | LMA       | M4             | Monosomía 10                                   | MLL +<br>t(10;11)                          | Si     |
| 20       | M    | 11 m                  | LMA       | M6             |  |  | Si     |
| 21       | F    | 8 m                   | LLA       | B COMÚN        |  |  | Si     |
| 22       | M    | 5 a 1 m               | LLA       | B COMÚN        | DEL (1) (p31),<br>ausencia del<br>cromosoma 20 |  | No     |
| 23       | M    | 3 a 3 m               | LLA       | B COMÚN        | 54 XY  |  | No     |

**TABLA 3. Características de los pacientes**

### 2.3 Obtención de muestras de control

Tras obtención del consentimiento informado, se utilizó muestra de médula ósea de un paciente pediátrico sin LA y muestras de sangre periférica de 6 adultos sanos familiares sin LA de pacientes con hemopatías conservadas en el Biobanco del idiPaz, para la realización del estudio de ligandos en médula ósea y de receptores de las células NK de forma basal y tras expansión respectivamente.

### 2.4 Obtención de datos clínicos y analíticos retrospectivos

Mediante la revisión de las Historias Clínicas se obtuvieron los siguientes datos:

- **Clínicos:**

Sexo, fecha de nacimiento, presencia de síndrome de Down, tipo de leucemia, fecha del diagnóstico, situación de la enfermedad en el momento de la recogida de muestras biológicas (diagnóstico inicial o recaída/refractariedad), tratamiento recibido, evolución de la enfermedad, estatus del paciente.

- **Analíticos:**

Hemograma al diagnóstico, características de la 1ª médula ósea recogida: mielograma, inmunofenotipo, cariotipo, biología molecular.

### 2.5 Obtención de muestras biológicas

Tras obtener el CI, se ha extraído a cada paciente, coincidiendo con la extracción de muestras necesarias para el diagnóstico de su enfermedad, una muestra de médula ósea (MO) y de sangre periférica (SP).

#### 2.5.1 Obtención de células de la enfermedad (blastos):

Con la muestra de MO obtenida del paciente, se ha procedido a la obtención de células mononucleadas, que corresponden con los blastos leucémicos, mediante la técnica de *Ficoll*.

#### 2.5.2 Obtención de células mononucleadas del paciente:

Con la muestra de SP obtenida del paciente, se ha procedido a la obtención de células mononucleadas, que corresponden con los linfocitos, dentro de los cuales se incluyen las células NK.

## 2.6 Fenotipado de las células NK mediante citometría de flujo

### 2.6.1 Fenotipado de los blastos leucémicos del paciente:

Se determinaron en los blastos leucémicos de los pacientes los ligandos para las células NK. Para ello se utilizó el citómetro Becton Dickinson FACS CANTO II, usando los siguientes anticuerpos: MICA-PE, ULBP1-PE, ULBP2-APC, ULBP4-PerCP-Cy5, ULBP3-PE y CD69-PE de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), MICA/MICB-, FAS-APC y CD112-PE de Biolegend Inc. (San Diego, CA, USA) HLA-A,B,C-PE de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) y CD155-FITC de AbD Serotec.

### 2.6.2 Fenotipado de las células NK del paciente:

Se determinaron en los pacientes los receptores de membrana (KIRs, NCRs, NKp30, NKp46, NKG2D, DNAM, TLRs), y estado de activación (CD25 y CD69). En todos los pacientes se realizó este análisis al finalizar la expansión y activación de las células NK. Para ello se utilizó el citómetro Becton Dickinson FACS CANTO II, usando los siguientes anticuerpos: CD3 PE-Cy7, CD 16 APC-Cy7, CD158b1 FITC, CD20-PE,CD45-FITC, CD69-FITC y NKG2D-APC, de Becton Dickinson y CD19-PE, CD56-APC, CD25-PE, CD158 a,h-PE y NKp44-PE de Beckman Coulter, CD158e (KIR 3DL1)-PE, CD69-PE,CD158i (KIR2DS4)-PE, CD337 (NKp30)-PE, CD335 (NKp46)-APC de Miltenyi Biotec, y TLR4 y TLR9 de Enzo Life Sciences AG, Lausen, Switzerland.

## 2.7 Expansión de las células NK de los pacientes

La expansión de las células NK se realizó a partir de las células NK aisladas mediante un cocultivo celular de éstas con la línea celular K562-mb-IL15-4BBI. Se estableció un ratio NK/K562-mbIL-15/4BBI de 0,1/1. Tras tres semanas de cocultivo en el medio CellGro SCGM medium (CellGenix) 10% suero humano AB+ IL-2 100 UI/ml se obtuvieron células NK activadas y expandidas.

## 2.8 Obtención de DNA genómico de los pacientes

A partir de las células NK obtenidas tras la expansión se extrajo DNA genómico mediante el kit QIAamp DNA Mini Kit ® (Qiagen). La técnica realizada se expone en el punto 1.6

## 2.9 Obtención del haplotipo KIR de los pacientes

A partir del DNA genómico de los pacientes se realizó el análisis de los genes KIR mediante el kit *Kir typing* kit ® (Miltenyi). La técnica realizada se expone en el punto 1.7

## **2.10 Estudio *in vitro* de la funcionalidad de las NKAЕ del paciente frente a la línea celular K562 y a los propios blastos**

Mediante fluorescencia resuelta en el tiempo (Eu-TDA) medida en fluorímetro (Tecan, Infinite 200) se ha determinado la citotoxicidad de las células NK activadas y expandidas y EMR negativas (células efectoras, E) frente a la leucemia de los pacientes (células diana, T). Se establecerán 4 ratios E/T, 8:1, 4:1, 2:1 y 1:1. Se emplearon las siguientes fórmulas para calcular la citotoxicidad específica y espontánea:

- % lisis específica= (lisis experimental-lisis espontánea)/ (máxima lisis-lisis espontánea) x100
- %lisis espontánea= (lisis espontánea-señal de fondo)/ (máxima lisis-señal de fondo) x100.

### **3. Procedimientos estadísticos**

La descripción de los datos cualitativos se realiza en forma de frecuencias absolutas y porcentajes y los datos cuantitativos mediante media  $\pm$  desviación típica, mediana, mínimo y máximo. La representación gráfica en todos los casos se ha hecho con diagramas de barras.

En el estudio retrospectivo:

- Se ha usado el método de Kaplan-Meier para estimar la distribución del tiempo hasta recidiva, tiempo hasta exitus y tiempo hasta 'recada o exitus'.
- La comparación entre los grupos según el tipo de haplotipo se ha realizado mediante el test "log-rank".
- Se han probado modelos de regresión de Cox (de riesgo proporcional) univariantes para cuantificar el riesgo de cada uno de los genes KIR en relación a los tres eventos mencionados (recada, exitus o bien 'recada o exitus').
- La evolución en el tiempo, de parámetros de la reconstitución inmune (NK, LT, LTCD4, LTCD8, LB) según los diferentes tipo de haplotipos, se ha estudiado usando modelos de regresión con efectos mixtos, para controlar las medidas repetidas en los mismos pacientes.

En el estudio prospectivo:

- Las diferencias en expresión de los ligandos de los blastos y receptores de las células NK según tipo leucemia (LLA/LMA), recada (si/no), exitus (si/no) o bien 'recada o exitus' (si/no) se han analizado usando el test de Mann-Whitney.

- Para los datos cualitativos de los genes KIR (0/1) la relación con tipo AP (LLA/LMA), recaída (si/no), exitus (si/no) o bien 'recaída o exitus' (si/no) se ha estudiado mediante el test exacto de Fisher.

Todas las pruebas estadísticas se han considerado bilaterales y como valores significativos, aquellos  $p$  inferiores 0.05.

Los datos se han analizado con el programa estadístico SAS 9.3 (SAS SAS Institute, Cary, NC, USA).

## **RESULTADOS**

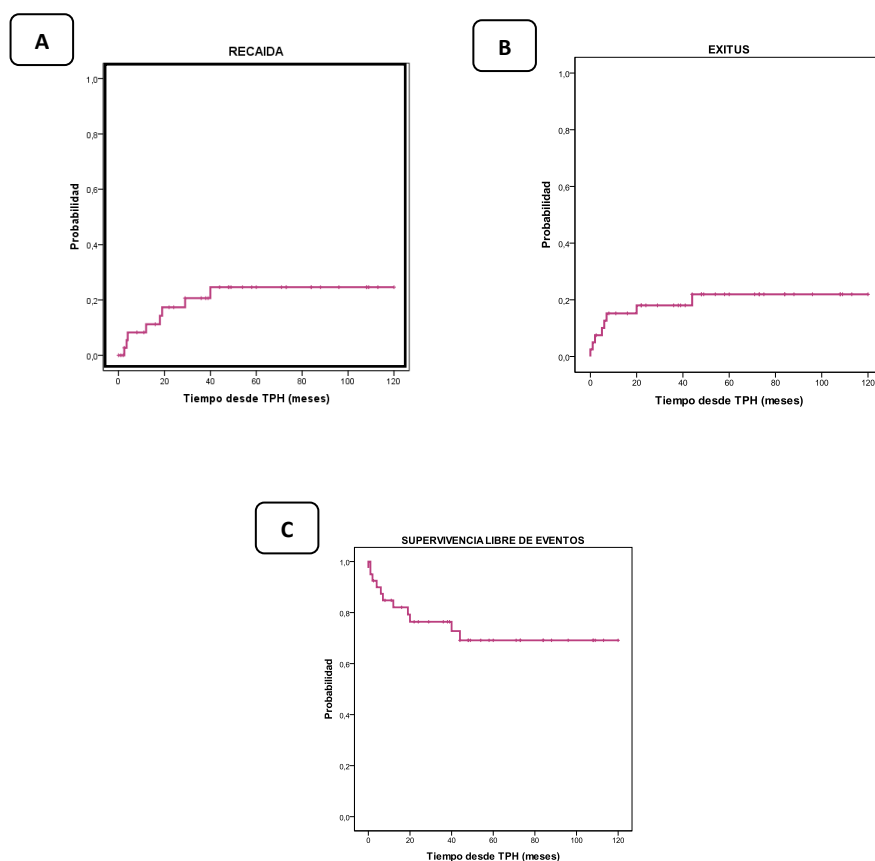


## RESULTADOS

### 1. Estudio del papel de las células NK en el TPH HLA idéntico

#### 1.1 Probabilidad de recaída, exitus y SLE de forma global

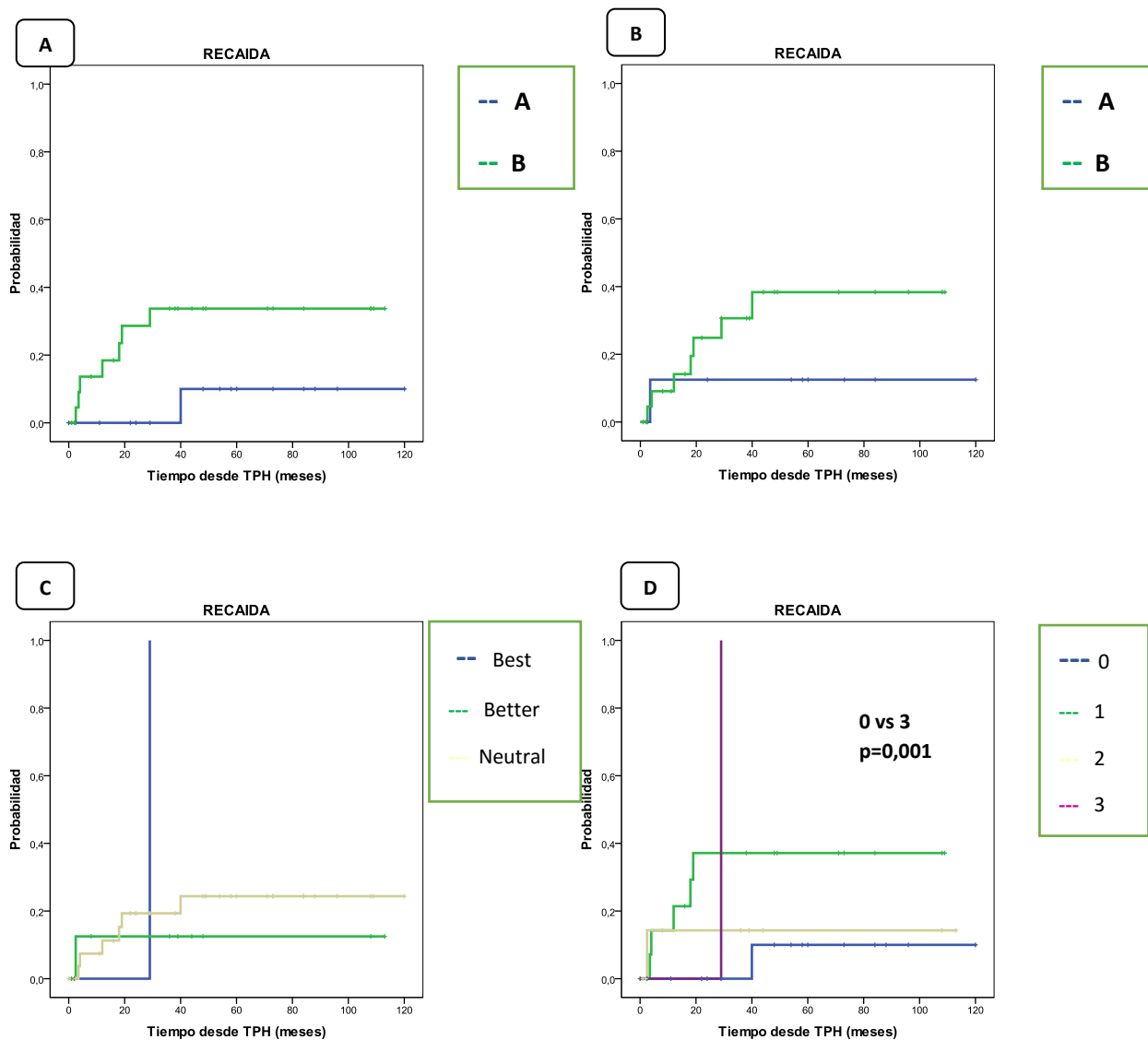
Se ha estudiado de forma global en todo el conjunto de pacientes la probabilidad de recaída, exitus y SLE en el periodo post-TPH (Figura 7)



**FIGURA 7.** a) Probabilidad de recaída de forma global 24,6 +/- 7,7%. b) Probabilidad de exitus de forma global 21,9 +/- 7%. c) Probabilidad de la supervivencia libre de eventos de forma global 69,1 +/- 7,9%.

## 1.2 Probabilidad de recaída en función del haplotipo del donante y paciente

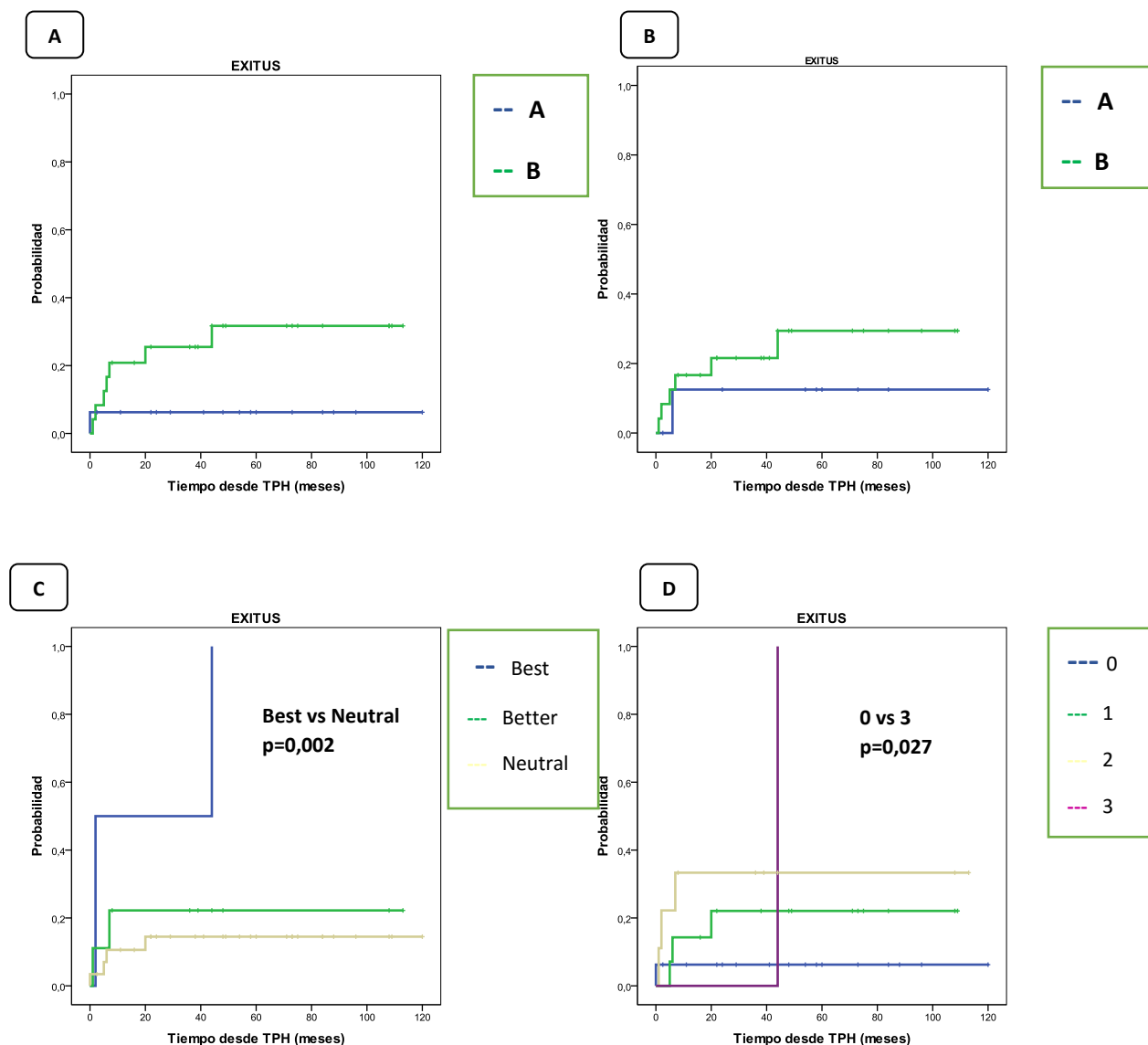
Se ha estudiado la probabilidad de recaída en el periodo post-TPH en función del haplotipo del donante, del paciente, y subtipos de haplotipo del donante (Figura 8)



**FIGURA 8. A)** En función del haplotipo del donante: haplotipo A 10  $\pm$  9,5 % y haplotipo B 33,7  $\pm$  10,5%. La diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,075$ ). **B)** En función del haplotipo del receptor: haplotipo A 12,5  $\pm$  11,7% y haplotipo B 38,4  $\pm$  11,9%. La diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,268$ ). **C)** En función de los subtipos de haplotipos del donante mediante Score descrito por Leung<sup>3</sup>: subtipo Best 100  $\pm$  0%, subtipo Better 12,5  $\pm$  11,7% y subtipo Neutral 24,4  $\pm$  8,8%. La diferencia entre las parejas resultantes de la combinación de los 3 subtipos no es estadísticamente significativa. **D)** En función de los subtipos de haplotipos del donante mediante la escala numérica descrita por Cooley<sup>82</sup>: subtipo 0 10  $\pm$  9,5%, subtipo 1 37,1  $\pm$  13,3%, subtipo 2 14,3  $\pm$  13,2% y subtipo 3 100  $\pm$  0%. La diferencia entre las parejas resultantes de la combinación de los 4 subtipos es estadísticamente significativa entre el subtipo 0 y el 3 ( $p = 0,001$ ), siendo el resto estadísticamente no significativas.

### 1.3 Probabilidad de exitus en función del haplotipo del donante y paciente

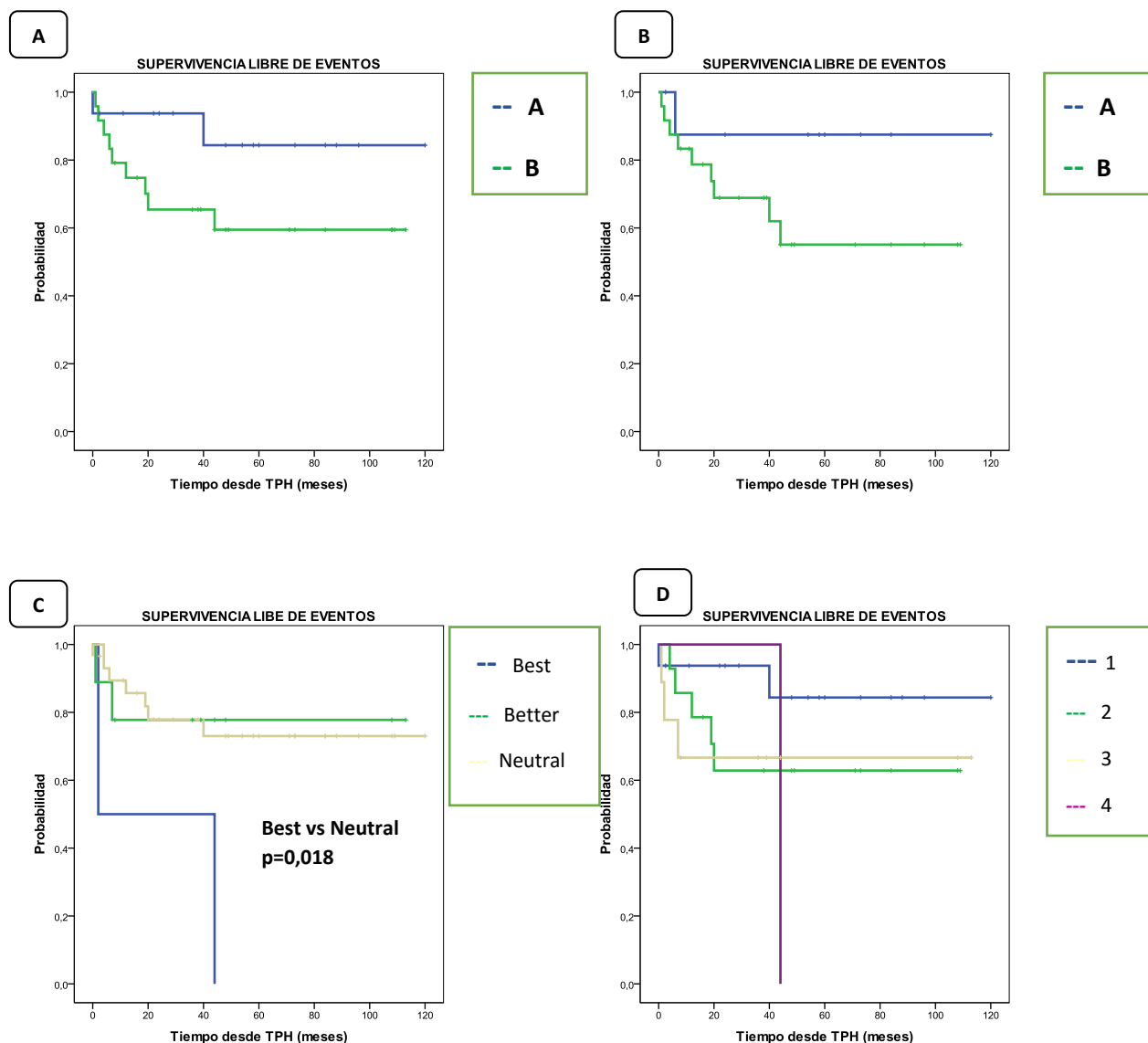
Se ha estudiado la probabilidad de exitus en el periodo post-TPH en función del haplotipo del donante, del paciente, y subtipos de haplotipo del donante (Figura 9)



**FIGURA 9. A)** En función del haplotipo de donante: haplotipo A 6,2 +/-6,1% y haplotipo B 31,7 +/-10,2%. Esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0,106$ ). **B)** En función del haplotipo del paciente: haplotipo A 12,5 +/-11,7% y haplotipo B 29,4 +/-10,7%. Esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $P=0,396$ ). **C)** En función de los subtipos de haplotipos del donante mediante el Score descrito por *Leung*<sup>3</sup>: subtipo Best 100 +/- 0%, subtipo Better 22,2 +/- 13,9% y subtipo Neutral 14,5 +/- 6,7%. La diferencia entre las parejas resultantes de la combinación de los 3 subtipos Best y Neutral es estadísticamente significativa ( $p=0,002$ ), siendo el resto estadísticamente no significativas. **D)** En función de los subtipos de haplotipos del donante mediante la escala numérica descrita por *Cooley*<sup>82</sup>: subtipo 0 6,2 +/-6,1%, subtipo 1 22,1 +/- 11,3%, subtipo 2 33,3 +/- 15,7% y subtipo 3 100 +/- 0%. La diferencia entre las parejas resultantes de la combinación de los 4 subtipos es estadísticamente significativa entre el subtipo 0 y el 3 ( $p=0,027$ ), siendo el resto estadísticamente no significativas.

#### 1.4 Probabilidad de SLE en función del haplotipo del donante y paciente

Se ha estudiado la probabilidad de SLE en el periodo post-TPH en función del haplotipo del donante, del paciente, y subtipos de haplotipo del donante (Figura 10)



**FIGURA 10.** **A)** función del haplotipo de donante: haplotipo A 15,6  $\pm$  10,4% y haplotipo B 40,5  $\pm$  10,7%. La diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0,107$ ). **B)** En función del haplotipo del receptor: haplotipo A 12,5  $\pm$  11,7% y haplotipo B 44,9  $\pm$  11,8%. Esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0,161$ ). **C)** En función de los subtipos de haplotipos del donante mediante el Score descrito por Leung<sup>3</sup>: subtipo Best 0  $\pm$  0%, subtipo Better 77,8  $\pm$  13,9% y subtipo Neutral 73  $\pm$  8,9%. La diferencia entre las parejas resultantes de la combinación de los 3 subtipos es estadísticamente significativa entre el subtipo Best y Neutral ( $p=0,018$ ), siendo el resto estadísticamente no significativas. **D)** En función de los subtipos de haplotipos del donante mediante la escala numérica descrita por Cooley<sup>82</sup>: subtipo 0 84,4  $\pm$  10,4%, subtipo 1 62,9  $\pm$  13,3%, subtipo 2 66,7  $\pm$  15,7% y subtipo 3 100  $\pm$  0%. La diferencia entre las parejas resultantes de la combinación de los 4 subtipos no es estadísticamente significativa

### 1.5 Estudio de la asociación entre los genes KIR de donantes y pacientes y reconstitución inmune de los pacientes con los eventos post-TPH

#### 1.5.1 Asociación con el evento port-TPH recaída (Tabla 4):

Se ha objetivado una asociación de varios genes de los que conforman en haplotipo B en el donante con una mayor probabilidad de recaída, siendo sólo estadísticamente significativa la asociación de KIR 2DL5ALL. La misma tendencia se ha observado en los genes KIR activadores del paciente, sin alcanzar la significación estadística. Por otro lado destaca un efecto beneficioso del gen 3DL1, integrante del haplotipo A, con una menor probabilidad de recaída.

| Gen KIR Donante | Significación | Exp (B) | IC (95%)     |
|-----------------|---------------|---------|--------------|
| 3DL1            | 0,037         | 0,75    | 0,007-0,852  |
| 2DL5 ALL        | 0,047         | 8,389   | 1,026-68,596 |
| 2DL5 b          | 0,062         | 7,830   | 0,903-67,858 |
| 2DS5            | 0,092         | 3,301   | 0,823-13,244 |
| 2DS3            | 0,094         | 3,435   | 0,810-14,564 |

| Gen KIR Paciente | Significación | Exp (B) | IC (95%)     |
|------------------|---------------|---------|--------------|
| 2DL5 b           | 0,062         | 7,830   | 0,903-67,858 |

TABLA 4.

#### 1.5.2 Asociación con el evento post-TPH exitus (Tabla 5):

Se ha objetivado la asociación de varios genes de los que conforman en haplotipo B en el donante con una mayor probabilidad de exitus, siendo sólo estadísticamente significativa la asociación de KIR 2DS1. La misma tendencia se ha objetivado en los genes KIR del receptor, no alcanzando la significación estadística ninguno de ellos. Por otro lado destaca una asociación de los genes KIR2DL3 y KIR 2DL1 en el donante y KIR 3DL1 en el paciente, integrantes del haplotipo A, con una menor probabilidad de exitus.

| Gen KIR Donante | Significación | Exp (B) | IC (95%)     |
|-----------------|---------------|---------|--------------|
| 2DL3            | 0,011         | 0,123   | 0,025-0,618  |
| 2DL1            | 0,016         | 0,053   | 0,005-0,581  |
| 2DS1            | 0,034         | 5,638   | 1,135-27,996 |
| 2DL5 b          | 0,068         | 7,185   | 0,863-59,828 |
| 2DL5 ALL        | 0,070         | 6,960   | 0,854-56,716 |
| 3DS1            | 0,071         | 3,749   | 0,894-15,717 |

| Gen KIR Paciente | Significación | Exp (B) | IC (95%)     |
|------------------|---------------|---------|--------------|
| 3DL1             | 0,026         | 0,065   | 0,006-0,720  |
| 2DL5 b           | 0,069         | 7,391   | 0,857-63,768 |
| 2DS3             | 0,070         | 3,858   | 0,895-16,636 |
| 2DS1             | 0,089         | 4,010   | 0,808-19,897 |

TABLA 5

### 1.5.3 Asociación con el evento post-TPH SLE (Tabla 6)

Se ha objetivado la asociación de varios genes de los que conforman en haplotipo B en el donante y en el receptor con una menor probabilidad de supervivencia libre de eventos, siendo sólo estadísticamente significativa la asociación de KIR 2DL5. Por otro lado destaca una asociación estadísticamente significativa entre los genes 2DL1 y 2DL3 en el donante y 3DL1 en el paciente, integrantes del haplotipo A, con una mayor probabilidad de supervivencia libre de eventos.

| Gen KIR Donante | Significación | Exp (B) | IC (95%)     |
|-----------------|---------------|---------|--------------|
| 2DL1            | 0,016         | 0,053   | 0,005-0,581  |
| 2DL3            | 0,032         | 0,186   | 0,040-0,866  |
| 2DL5 ALL        | 0,041         | 4,967   | 1,067-23,122 |
| 2DS3            | 0,051         | 3,43    | 0,996-11,813 |
| 2DL5 b          | 0,052         | 4,817   | 0,988-23,486 |

| Gen KIR Paciente | Significación | Exp (B) | IC (95%)     |
|------------------|---------------|---------|--------------|
| 3DL1             | 0,026         | 0,065   | 0,006-0,720  |
| 2DS3             | 0,058         | 3,514   | 0,960-12,861 |
| 2DL5 b           | 0,078         | 4,235   | 0,849-21,126 |

TABLA 6

### 1.6 Estudio de la asociación entre la presencia/ausencia de C1, C2, Bw4 en el donante y sus correspondientes ligandos en el paciente con los eventos post-TPH

No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre la presencia de disparidad KIR-ligando entre donante y paciente (presencia de KIR2DL2/3 en el donante y ausencia de HLA-C1 en el receptor, presencia de KIR2DL1 en el donante y ausencia de HLA-C2 en el receptor o presencia de KIR3DL1 en el donante y ausencia de HLA-Bw4 en el receptor) y los eventos post-TPH.

### 1.7 Reconstitución inmune post-TPH

#### 1.7.1 Reconstitución inmune global (Figura 11 y Tabla 6 del Anexo)

Se han recogido los datos de la cifra de células NK, linfocitos T totales, linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y linfocitos B en los días +30, +60, +90, +120, +360 y +720 post-TPH en el conjunto de todos los pacientes.

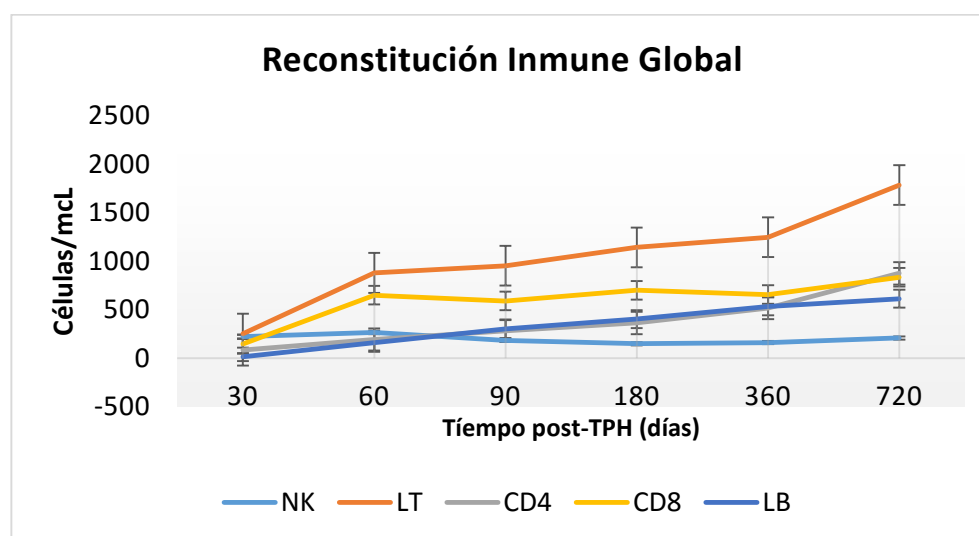


FIGURA 11

### 1.7.2 Reconstitución inmune en función del haplotipo del donante (haplotipo A Figura 6 y Tabla 7 del Anexo y haplotipo B (Figura 12 y Tabla 8 del Anexo)

Se exponen a continuación los datos de la cifra de células NK, linfocitos T totales, linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y linfocitos B en los días +30, +60, +90, +120, +360 y +720 post-TPH, en función del haplotipo del donante. En el grupo con haplotipo A se objetiva un descenso de las cifras de células NK a partir del día +60, con un ascenso notable de los linfocitos T a partir de la misma fecha, y con una diferencia entre ambos grupos celulares desde ese momento mucho mayor que la que se produce en el grupo con haplotipo B, donde se objetiva un repunte en la cifra de células NK en el día +60, con posterior descenso paulatino, y con un ascenso del número de linfocitos T mucho más lento, con una diferencia menor entre ambos grupos celulares.

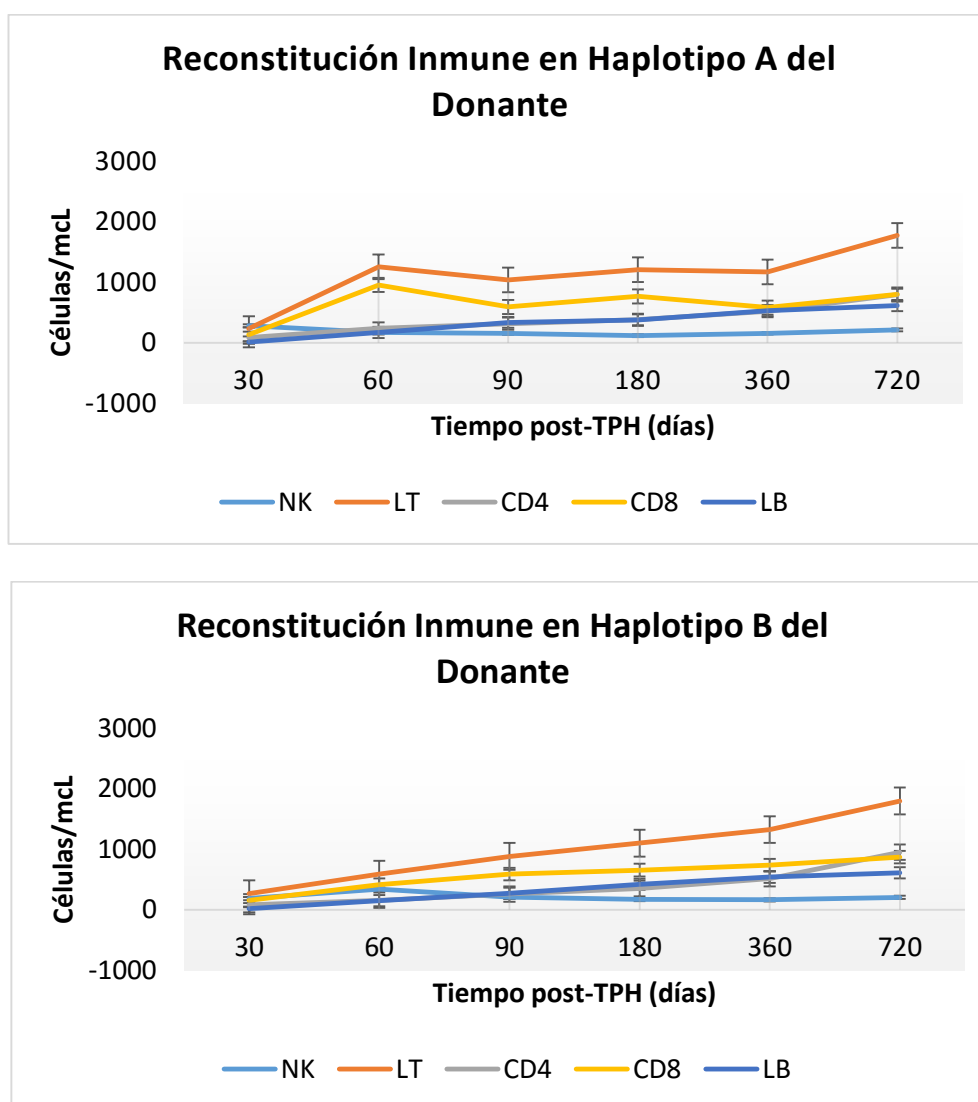
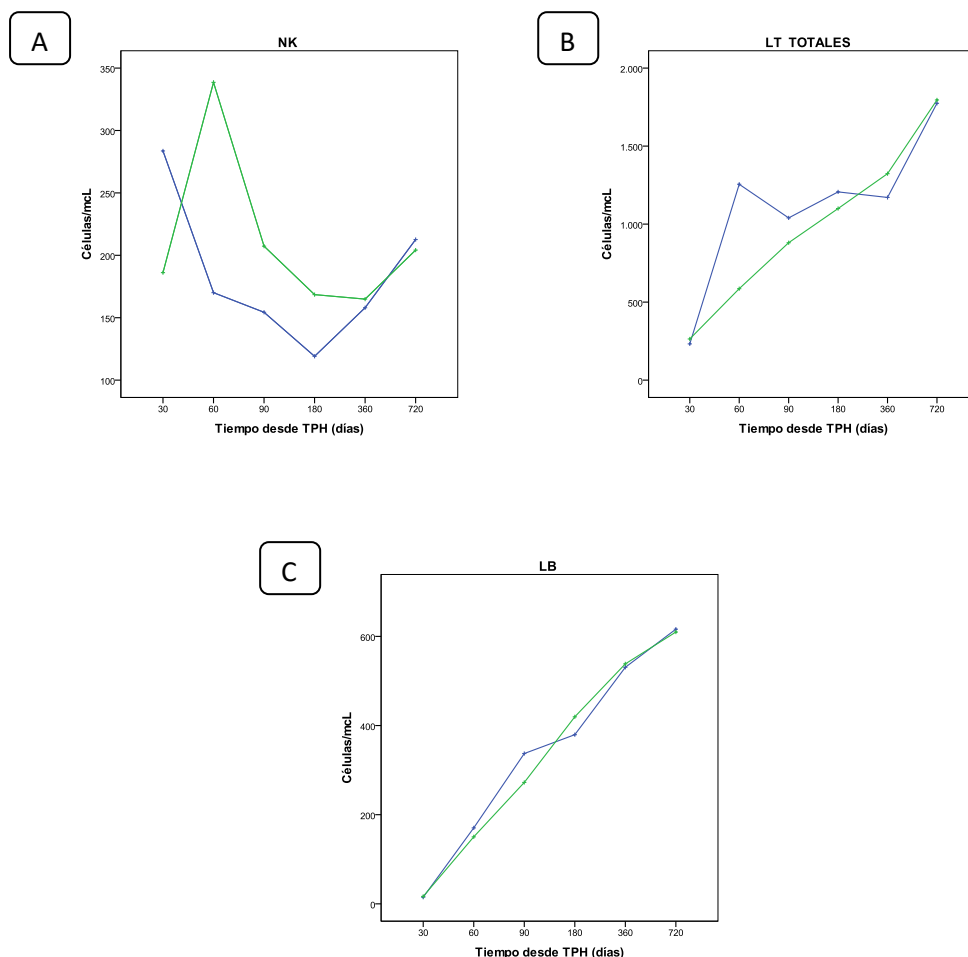


FIGURA 12

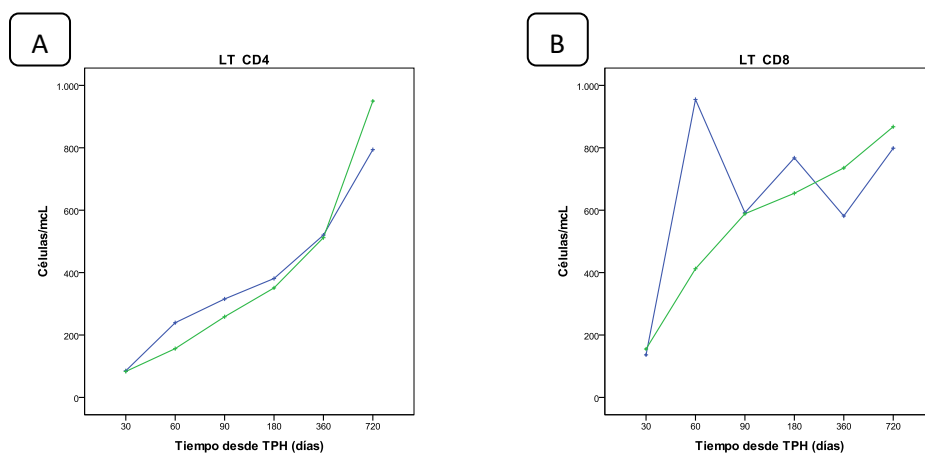


### 1.7.3 Reconstitución inmune de cada tipo celular según el haplotipo del donante (Figura 13 y 14)

Se han estudiado las cifras de células NK, LT totales, LT CD4, LT CD8 y LB en seis momentos post-TPH en el grupo de donantes con haplotipo A y en el grupo de donantes con haplotipo B



**FIGURA 13. Células NK (A):** destaca una diferencia no estadísticamente significativa ( $p=0,088$ ) en el día +60 post-TPH, con una media de **338,55/mcL** en el grupo con donante con haplotipo B frente a una media de **170,07/mcL** en el grupo con donante con haplotipo A. **Linfocitos T (B):** existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,011$ ) en el día +60 post-TPH, con una media de **1255,35/mcL** en el grupo con donante con haplotipo A frente a una media de **586,05/mcL** en el grupo con donante con haplotipo B. **Linfocitos B (C):** aquí, de forma similar a los linfocitos CD4, la cinética post-TPH es similar en ambos haplotipos, con un ascenso progresivo de la cifra de los mismos a lo largo del tiempo.



**FIGURA 14. Linfocitos T CD4 (A)** como se objetiva en el gráfico, la cinética post-TPH de este grupo celular es similar en ambos haplotipos, con un ascenso progresivo de la cifra de los mismos a lo largo del tiempo. **Linfocitos T CD8 (B):** destaca también en este grupo celular una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,007$ ) en el día +60 post-TPH, siendo la cifra de los mismos de **954,78/mcL** en el grupo con donante con haplotipo A y de **412,33** en el grupo con donante con haplotipo B. Estos hallazgos sugieren que la diferencia en la cifra total de linfocitos T post-TPH en ambos haplotipos, más marcada en el día +60, se produce a expensas del ascenso de los linfocitos T CD8.

## 1.8 Estudio de la asociación entre la reconstitución inmune de los pacientes con los eventos post-TPH

### 1.8.1 Asociación con el evento post-TPH recaída (Tabla 7):

Se ha objetivado que una mayor cifra de LB y células NK en el día +60 post-TPH se asocia con una mayor probabilidad de recaída.

| Célula y día post-TPH | Significación | Exp (B) | IC (95%)    |
|-----------------------|---------------|---------|-------------|
| LB +30                | 0,024         | 1,014   | 1,002-1,026 |
| NK +60                | 0,014         | 1,003   | 1,001-1,005 |

TABLA 7

### 1.8.2 Asociación con el evento post-TPH exitus (Tabla 8):

Se ha objetivado que una mayor cifra de LT CD4 en el día +60 disminuye la probabilidad de exitus, mientras que una mayor cifra de células NK en ese momento la aumenta.

| Célula y día post-TPH | Significación | Exp (B) | IC (95%)    |
|-----------------------|---------------|---------|-------------|
| LT CD4 +30            | 0,039         | 0,973   | 0,948-0,999 |
| NK +60                | 0,015         | 1,001   | 1,000-1,003 |

TABLA 8

### 1.8.3 Asociación con el evento post-TPH SLE (Tabla 9)

Se ha objetivado que una mayor cifra de células NK en el día +60 se asocia con una peor SLE.

| Célula y día post-TPH | Significación | Exp (B) | IC (95%)    |
|-----------------------|---------------|---------|-------------|
| NK +60                | 0,015         | 1,001   | 1,000-1,003 |

TABLA 9

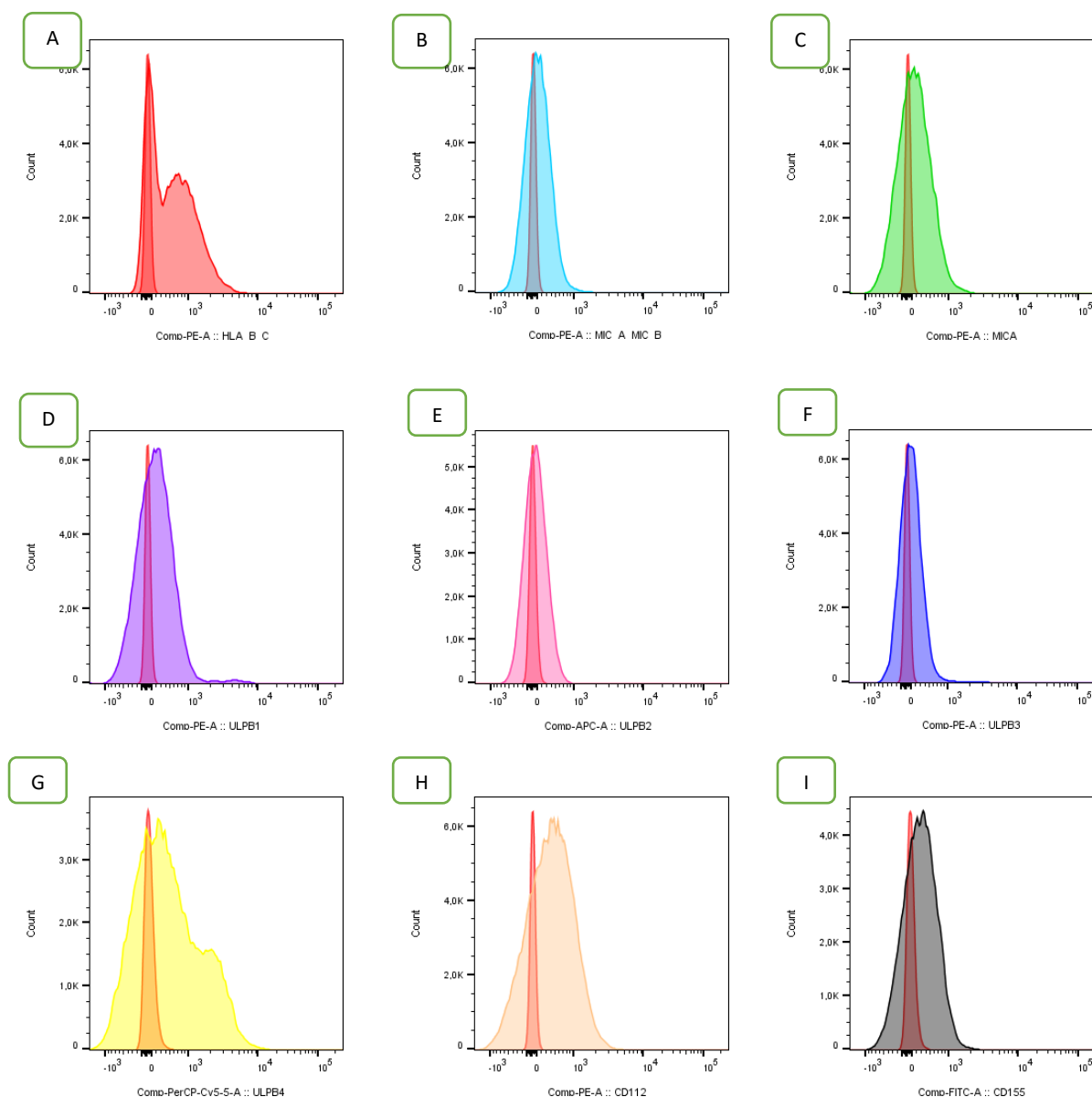
## 2. Estudio del papel de las células NK en la leucemia aguda

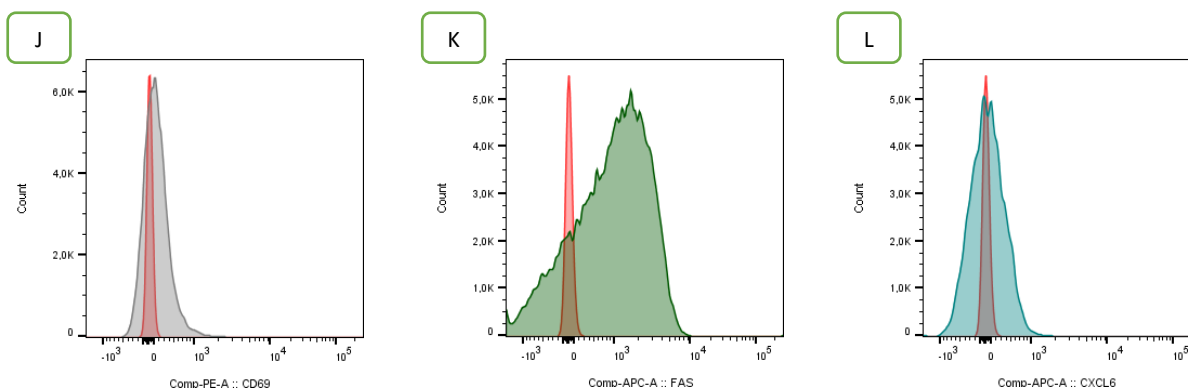
### 2.1 Características fenotípicas de los pacientes

#### 2.1.1 Expresión en los blastos de las moléculas de unión a la célula NK

Se ha estudiado en 19 de los pacientes, mediante citometría de flujo multiparamétrica, la expresión en superficie de los blastos de los siguientes marcadores, ligandos para diversos receptores expresados en la superficie de la célula NK: HLA-I, MICA/B, CXCL6, MICA, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, FAS, CD155, CD112 y CD69. También se ha estudiado la relación (cociente) entre los ligandos MICA/B, MICA, ULBP1, ULBP2, ULBP3 y ULBP4 respecto al HLA-I.

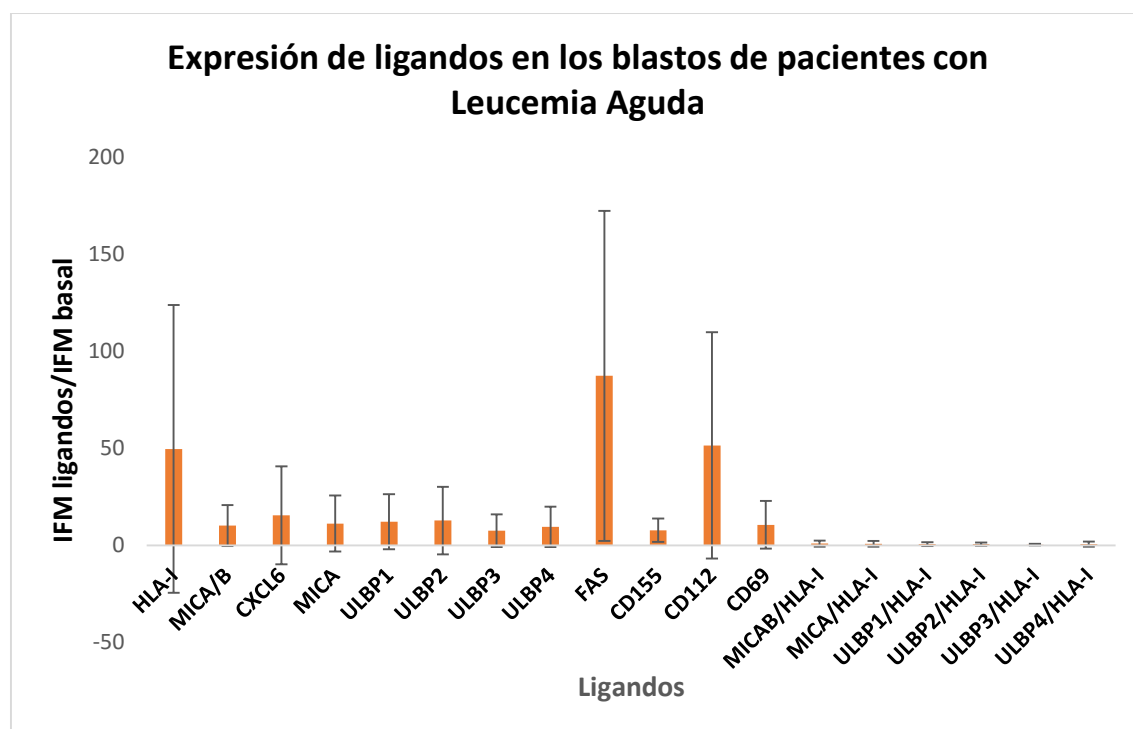
A continuación se exponen, a modo de ejemplo, las imágenes de citometría de flujo, analizadas mediante inmunofluorescencia media (IFM), del análisis de los ligandos realizado a uno de los pacientes (Figura 15)





**FIGURA 15.** Moléculas expresadas en la superficie de la célula NK. A) HLA. B) MICA/B. C) MICA. D) ULBP1. E) ULBP2. F) ULBP3. G) ULBP4. H) CD112. I) CD155. J) CD69. K) FAS. L) CXCL6

### 2.1.2 Expresión general (Figura 16 y Tabla 9 del Anexo)



**FIGURA 16.** Expresión general de los ligandos en los blastos (IFM de cada ligando/IFM basal +/- DE)

### 2.1.3 Estratificado en función del tipo de leucemia aguda (Figura 17, Tabla 10 y Tabla 10 del Anexo)

Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función del tipo de leucemia (15 pacientes con LLA y 4 pacientes con LMA), y se ha comparado la expresión de ligandos en ambos. Se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre los cocientes ULBP1/HLA-I ( $p=0,036$ ) y ULBP2/HLA-I ( $p=0,009$ ) siendo esta relación menor en las leucemias agudas linfoblásticas respecto a las mieloblásticas. También existe diferencia, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativa en la expresión de CD69 ( $p=0,054$ ), siendo mayor en las LLA frente a las LMA.

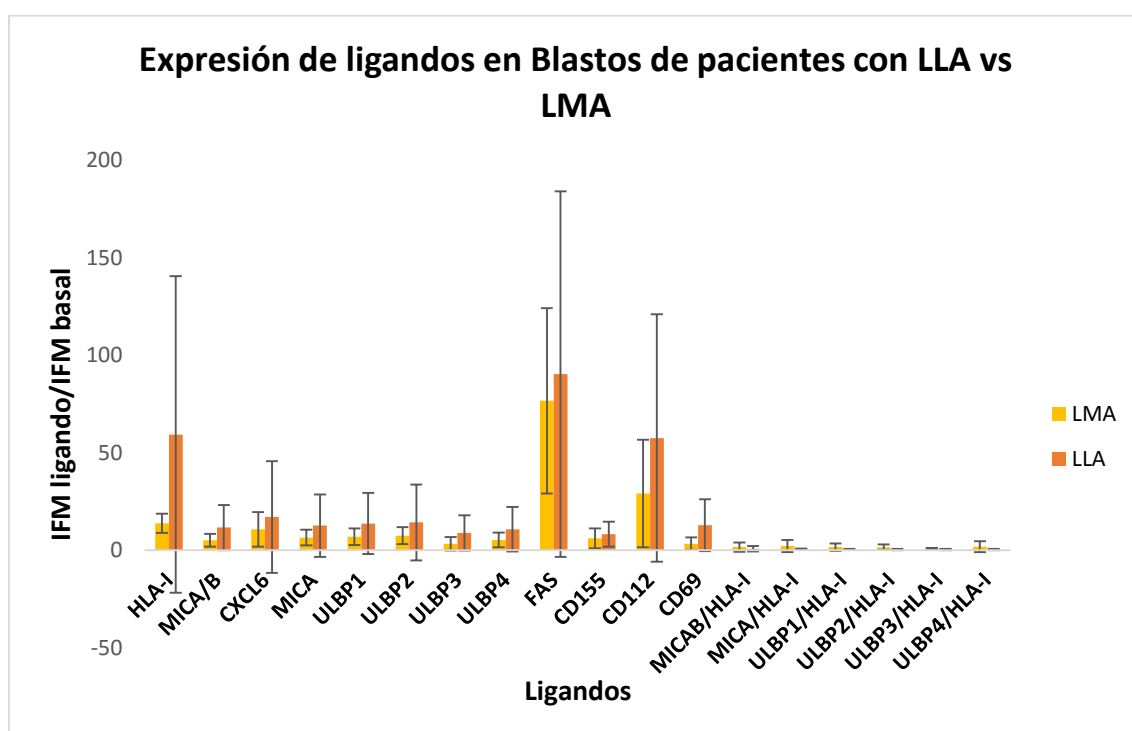


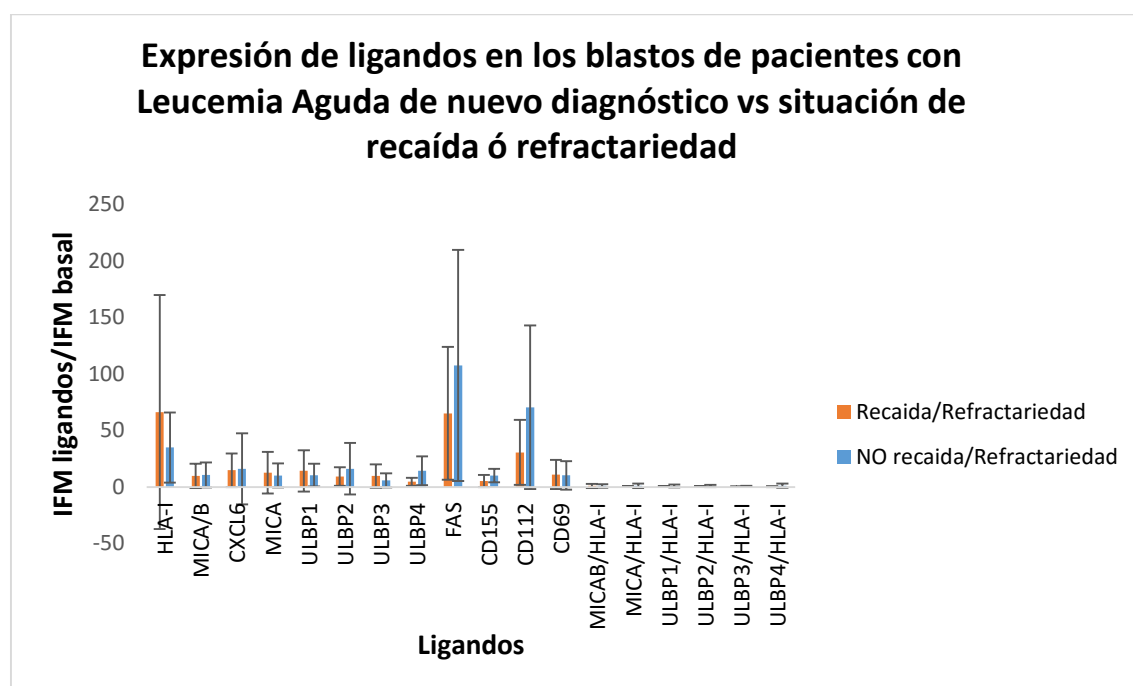
FIGURA 17. Expresión de los ligandos en los blastos (IFM de cada ligando/IFM basal  $\pm$  DE) en el grupo de pacientes con LMA y en el grupo de pacientes con LLA

| Ligando     | Mann-Whitney | Z      | Asymp. Sig (2 –tailed) |
|-------------|--------------|--------|------------------------|
| ULBP2/HLA-I | 4,000        | -2,605 | 0,009                  |
| ULBP1/HLA-I | 9,000        | -2,101 | 0,036                  |
| CD69        | 9,000        | -1,925 | 0,054                  |

TABLA 10

### 2.1.4 Estratificado en función del estado de la leucemia (Figura 18, Tabla 11 y Tabla 11 del Anexo)

Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función de la situación de la leucemia en el momento de realizar el estudio (10 pacientes con leucemia de nuevo diagnóstico y 9 pacientes con leucemia en situación de recaída o refractariedad), y se ha comparado la expresión de ligandos en ambos. Se ha encontrado que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes que se encontraban en situación de recaída o refractariedad en el momento de este estudio frente a las leucemias de nuevo diagnóstico en la expresión de ULBP4 ( $p=0,009$ ) siendo menor en los pacientes en situación de recaída o refractariedad. También es menor en esos pacientes el cociente ULBP4/HLA-I, aunque sin alcanzar la significación estadística. Se encuentra así mismo una menor expresión de CD155 en los pacientes en situación de recaída o refractariedad, sin alcanzar igualmente la significación estadística ( $p=0,086$ ).



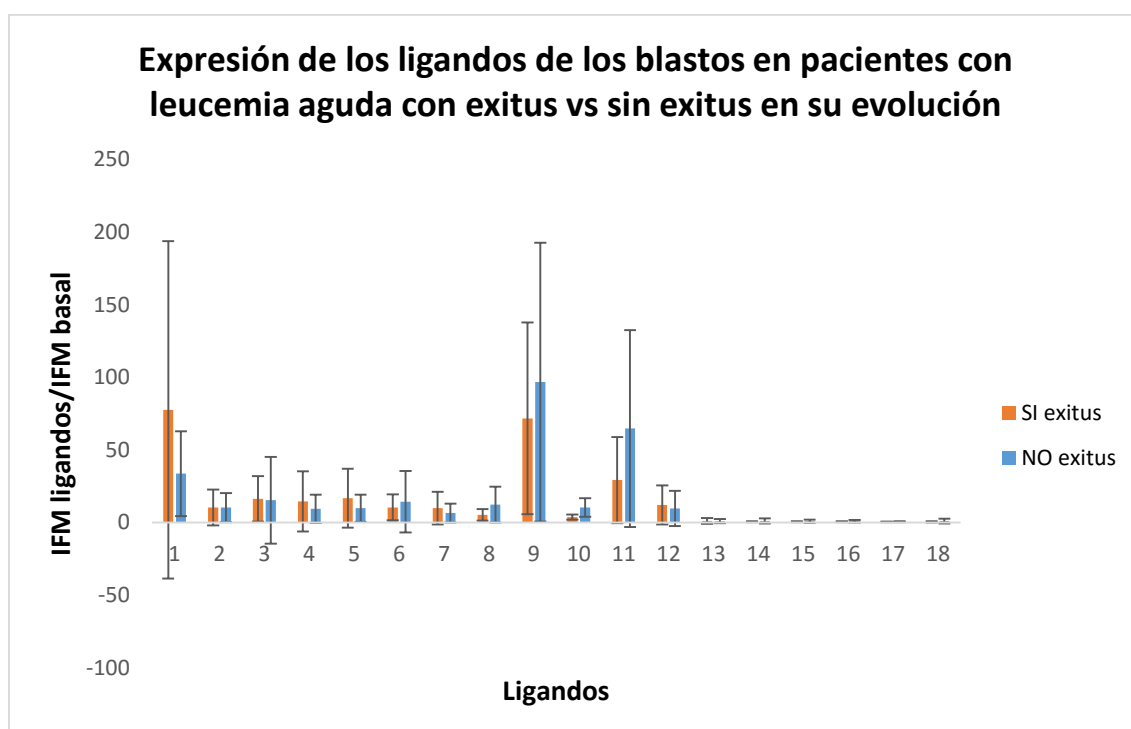
**FIGURA 18.** Expresión de los ligandos en los blastos (IFM de cada ligando/IFM basal +/- DE) en el grupo de pacientes con recaída y/o refractariedad y en el grupo de pacientes de nuevo diagnóstico

| Ligando     | Mann-Whitney | Z      | Asymp. Sig (2 –tailed) |
|-------------|--------------|--------|------------------------|
| ULBP4       | 11,000       | -2,605 | 0,009                  |
| ULBP4/HLA-I | 21,00        | -1,723 | 0,085                  |
| CD155       | 24,000       | -1,715 | 0,086                  |

**TABLA 11**

### 2.1.5 Estratificado en función de la evolución (exitus si/no) (Figura 19, Tabla 12 y Tabla 12 del Anexo)

Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función de la evolución de la leucemia durante el estudio (12 pacientes vivos y 7 exitus), y se ha comparado la expresión de ligandos en ambos. Se ha objetivado una diferencia no estadísticamente significativa en la expresión del ligando CD155 ( $p=0,083$ ) entre los pacientes que han evolucionado a exitus frente a aquellos que no lo han hecho en nuestro estudio, siendo menor en los fallecidos.



**FIGURA 19.** Expresión general de los ligandos en los blastos (IFM de cada ligando/IFM basal +/- DE) en el grupo de pacientes con y sin evolución a exitus

| Ligando | Mann-Whitney | Z      | Asymp. Sig (2 –tailed) |
|---------|--------------|--------|------------------------|
| CD155   | 14,000       | -1,735 | 0,083                  |

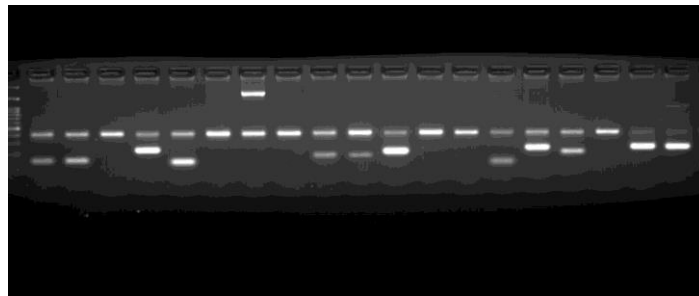
**TABLA 12**



## 2.2 Características genotípicas:

### 2.2.1 Análisis de los genes KIR y Haplotipo KIR de los pacientes (Figura 21)

Se ha realizado un análisis global de los genes KIR en 22 de los pacientes con leucemia aguda (de “novo” o recaída). En ellos se ha estudiado, mediante la técnica de *KIR typing*, la presencia o no en el genoma de los siguientes genes: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5ALL, 2DL5a, 2DL5b, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4del, 2DS4inv, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1, 3DP1. Se expone a continuación, a modo de ejemplo, la imagen del *KIR typing* realizado a uno de los pacientes.



**FIGURA 20. Ejemplo de gel con resultado de un *KIR typing***

Se trata de un paciente con haplotipo B, ya que posee el gen 2DL5 b (pocillo 7º empezando por la izquierda), gen incluido en el haplotipo B

### 2.2.2 Análisis general de los genes KIR (Figura 21 y Tabla 13 del ANEXO)

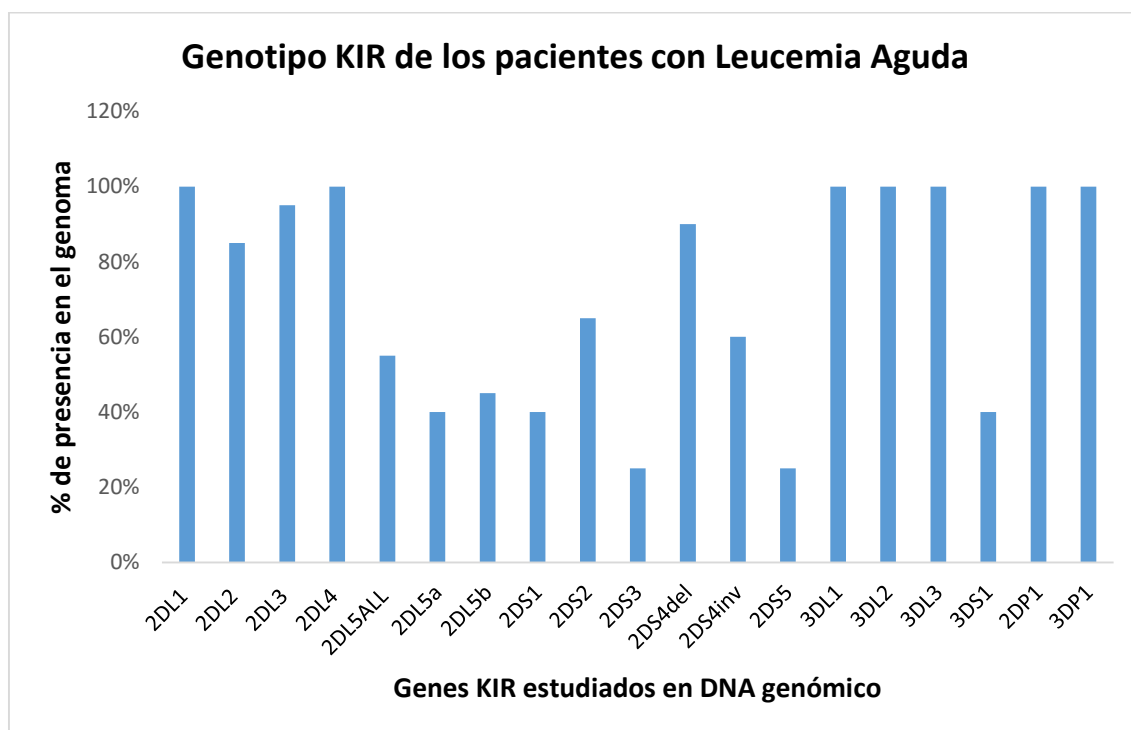
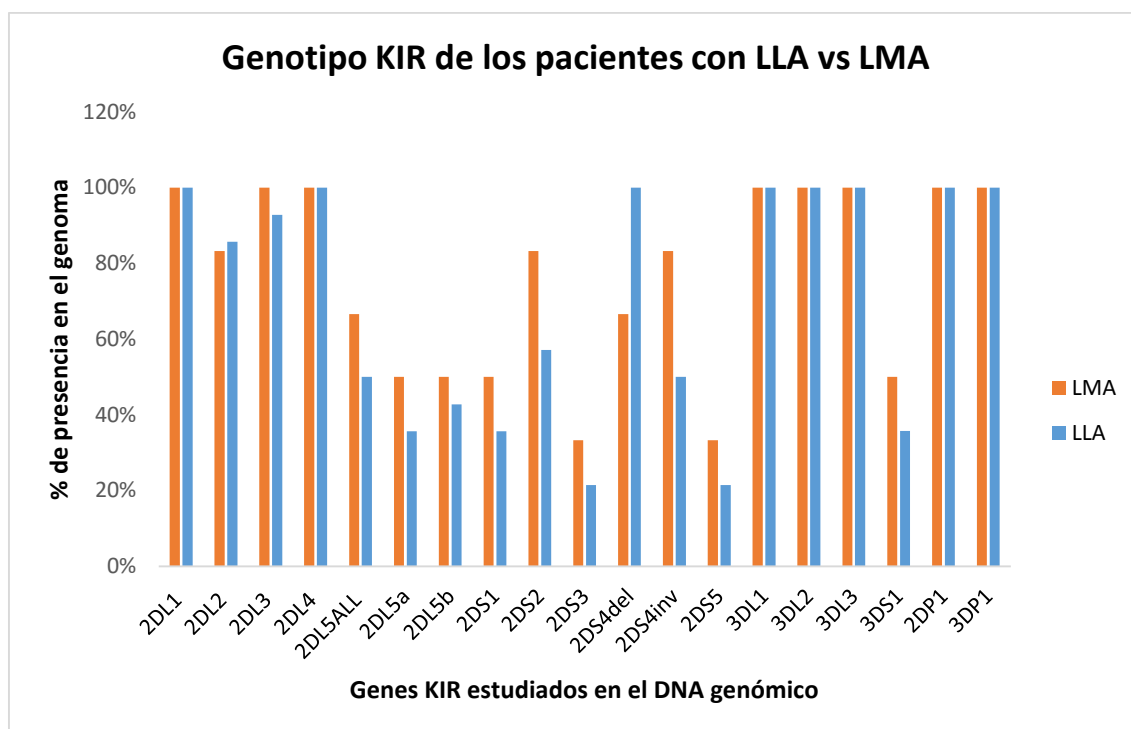


FIGURA 21. Presencia de los genes KIR (estudiados en DNA) en el conjunto de pacientes con LA

### 2.2.3 Estratificado en función del tipo de leucemia aguda (Figura 22, Tabla 13 y Tabla 14 del Anexo):

Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función del tipo de leucemia, estudiando en los mismos la presencia en el genoma de los distintos genes KIR y realizando una comparativa entre ambos. Se ha identificado una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,026$ ) en la posesión del gen *2DS4 del* en función del tipo de leucemia aguda, siendo mayor en los pacientes con leucemias agudas linfoblásticas versus mieloblásticas.



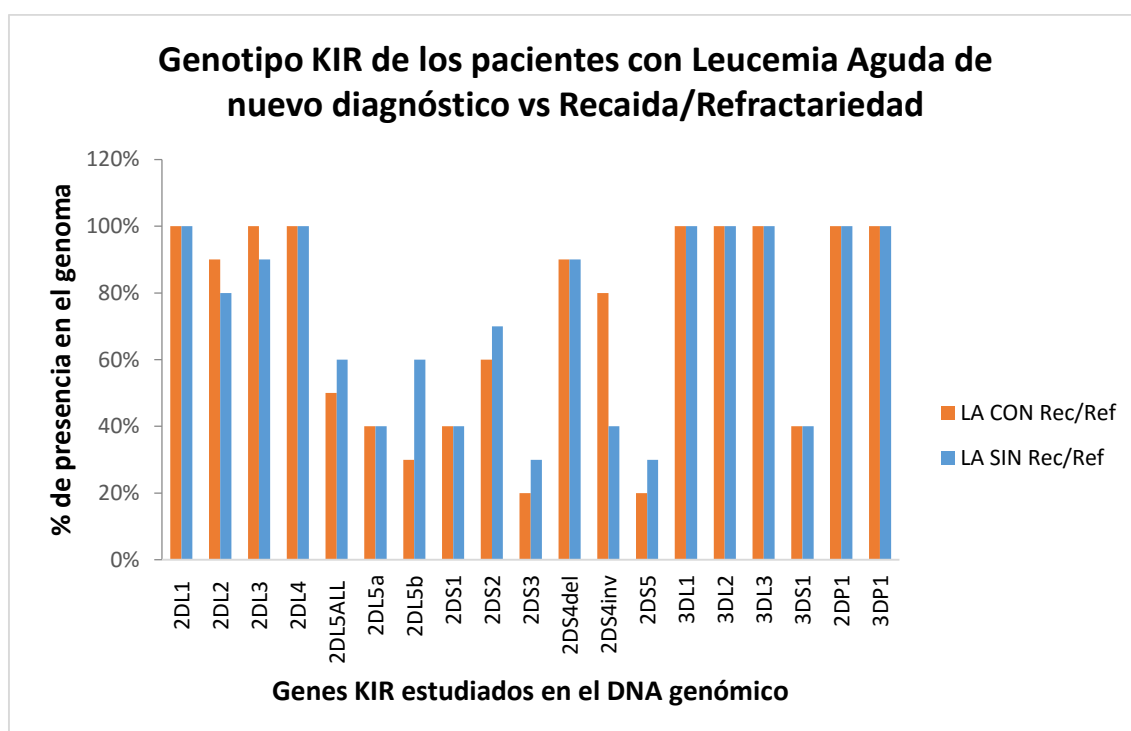
**FIGURA 22.** Presencia de los genes KIR (estudiados en DNA) en el grupo de pacientes con LMA y en el grupo de pacientes con LLA

| GEN KIR  | Pearson Chi-Square<br>(Asymp. Sig 2-<br>sided) | Likelihood<br>Ratio (Asymp.<br>Sig 2-sided) | Linear-by-Linear Association<br>(Asymp. Sig 2-sided) |
|----------|--|---|--|
| 2DS4 del | 0,023  | 0,021                                       | 0,026  |

**TABLA 13**

#### 2.2.4 Estratificado en función del estado de la leucemia (de “novo” vs recaída/refractoriedad) (Figura 23, y Tabla 15 del Anexo):

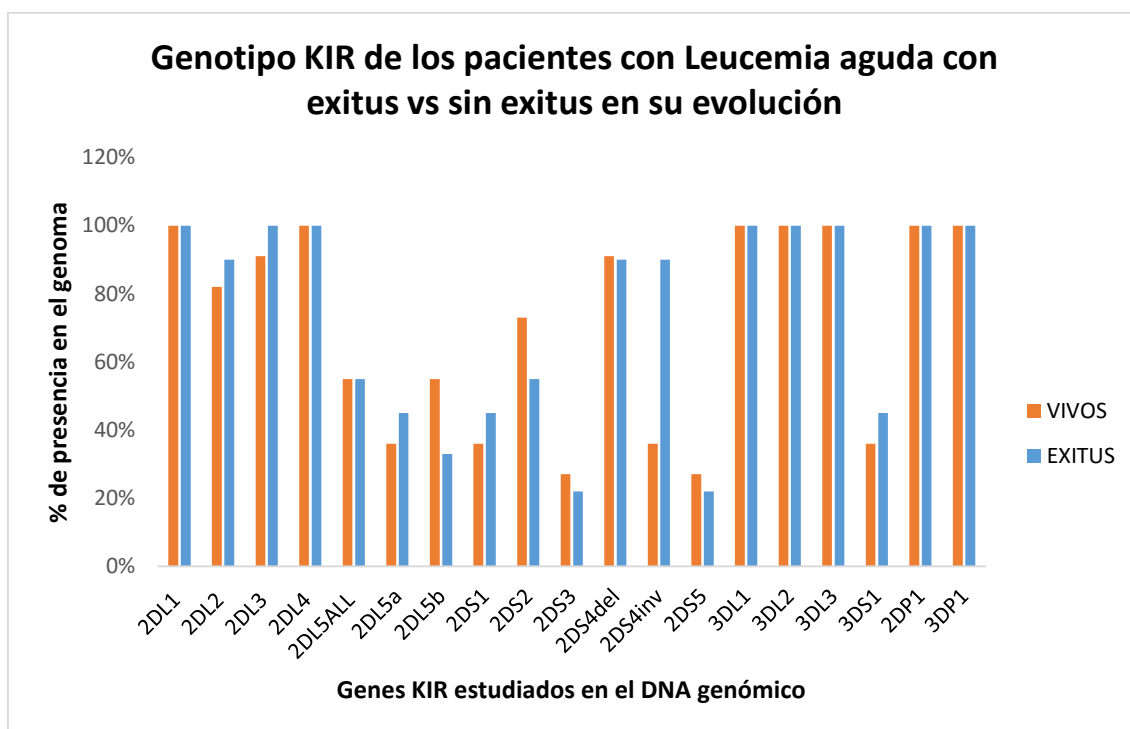
Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función del estado de la leucemia, estudiando en los mismos la presencia en el genoma de los distintos genes KIR y realizando una comparativa entre ambos. No se ha encontrado ninguna diferencia estadísticamente significativa.



**FIGURA 23.** Presencia de los genes KIR (estudiados en DNA) en el grupo de pacientes con recaída y/o refractariedad y en el de nuevo diagnóstico

#### 2.2.5 Estratificado en función de la evolución (exitus si/no) (Figura 24, Tabla 14 y Tabla 16 del Anexo):

Se ha dividido a los pacientes en dos grupos en función de la evolución de la enfermedad, estudiando en los mismos la presencia en el genoma de los distintos genes KIR y realizando una comparativa entre ambos. Se ha objetivado una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,028$ ) en presencia del gen 2DS4 *inv* entre los pacientes que han evolucionado a exitus frente a aquellos que no lo han hecho en nuestro estudio, siendo mayor en los fallecidos.



**FIGURA 24.** Presencia de los genes KIR (estudiados en DNA) en el grupo de pacientes con y sin evolución a exitus

| GEN KIR  | Pearson Chi-Square<br>(Asymp. Sig 2-sided) | Likelihood<br>Ratio (Asymp.<br>Sig 2-sided) | Linear-by-Linear Association<br>(Asymp. Sig 2-sided) |
|----------|--|---|--|
| 2DS4 inv | 0,024                                      | 0,018                                       | 0,028  |

**TABLA 14**

### 3. Expansión de las células NK y fenotipo de las NKAE

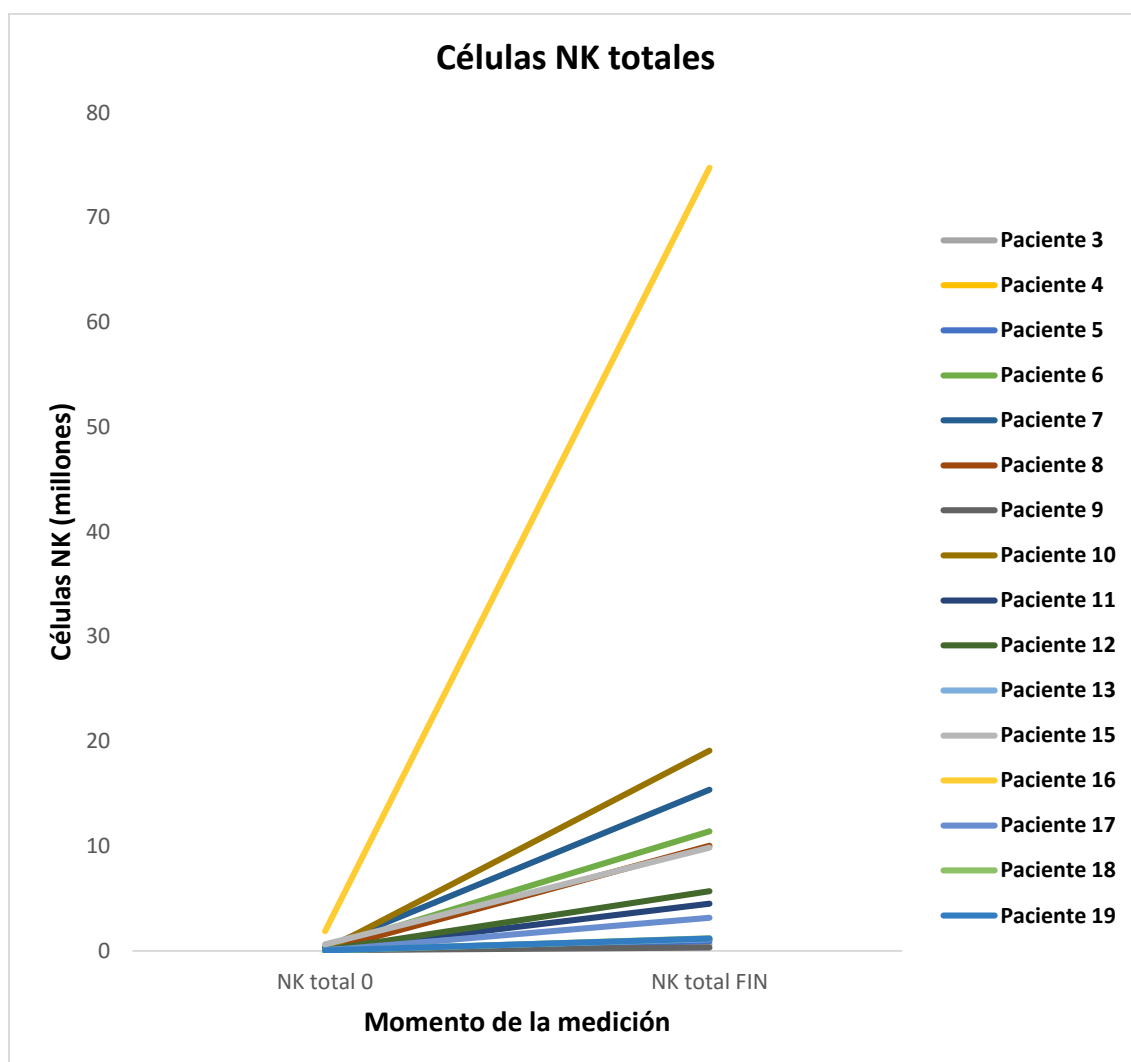
Como se expone a continuación, el resultado de estas expansiones ha sido muy heterogéneo en cuanto a cuantía celular y funcionalidad de las mismas, sin alcanzar los resultados postulados teóricamente, probablemente por características inherentes a las propias muestras (extraídas a pacientes con leucemia aguda en el momento del diagnóstico).

#### 3.1 Dinámica de las expansiones

##### 3.1.1 Celularidad total (Figura 25 y Tabla 17 del Anexo):

En los 19 pacientes se programó realizar expansión de células NK por disponibilidad de la muestra. En ellos se ha realizado un análisis del porcentaje y número total de células NK en el

momento de iniciar la expansión y al final de la misma tras 21 días de cocultivo. El estudio se ha realizado mediante conteo del número total de células en cámara de Neubauer y análisis por citometría de flujo del porcentaje de células NK. En 2 de ellos no se dispone de los datos de celularidad global al inicio de la expansión, y en 3 de ellos no se dispone de los datos de celularidad global al final de la expansión, con lo que no ha podido realizarse el cálculo aquí expuesto.



**FIGURA 25.** Resumen de la dinámica de las expansiones del conjunto de pacientes, expresada en cada uno de ellos con cifra de células NK al inicio y al final de la misma

### 3.1.2 Porcentaje de células NK obtenidos a lo largo de la expansión (Tabla 18 del anexo):

En todas las expansiones se ha planificado recoger el dato de porcentaje de células NK como mínimo al inicio (día 0) y al final de la expansión (día 21). No obstante, se ha perdido en 2

pacientes el dato del inicio y en 1 paciente el dato del final. Además, en 8 pacientes se ha recogido el dato del porcentaje de células NK en el día +7, y en 10 pacientes en el día +14.

### 3.2 Celularidad de las expansiones

#### 3.2.1 Comparativa de la distribución basal de mononucleares de SP entre sanos y pacientes con leucemia aguda (Figura 27 y Tabla 19 del Anexo):

Se ha comparado la celularidad basal en el grupo de pacientes frente a un grupo control sano. Se ha objetivado un porcentaje basal de células NK, NKT y NK subtipo *dim* mayor en el grupo sano que en el de los pacientes, siendo estas diferencia estadísticamente significativas ( $p=0,008$ ,  $p=0,003$  y  $p=0,040$  respectivamente). Por otro lado destaca un porcentaje mayor de LB en el grupo de pacientes respecto a los controles sanos, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

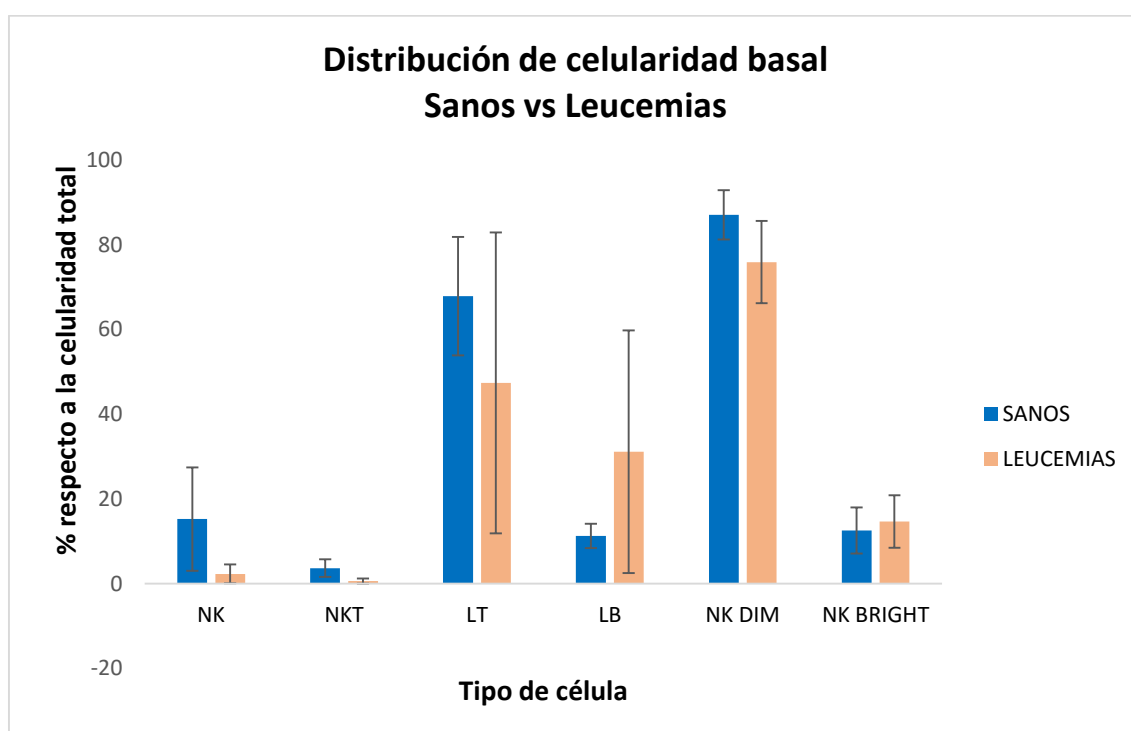
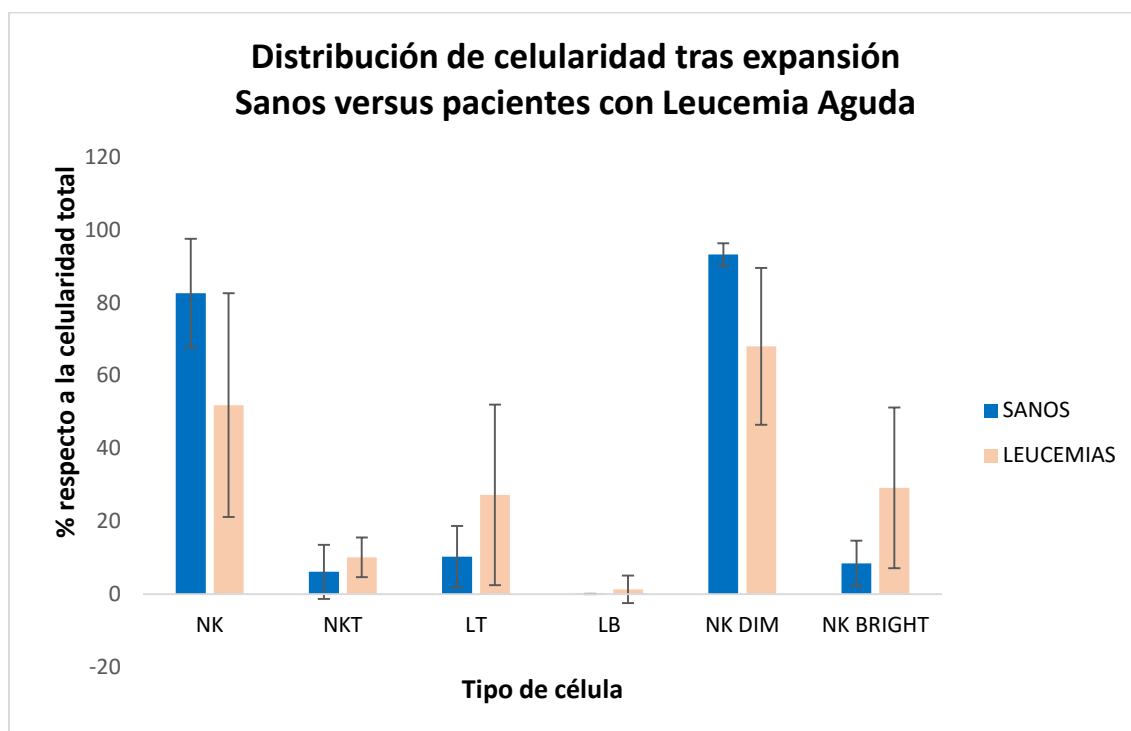


FIGURA 26. Celularidad basal de los linfocitos (% respecto a la celularidad absoluta +/- DE) en el grupo de pacientes y en el grupo de sanos.

#### 3.2.2 Comparativa de la distribución tras la expansión de mononucleares de SP entre sanos y pacientes con leucemia aguda (Figura 27 y Tabla 20 del Anexo):

Se ha comparado la celularidad tras la expansión en el grupo de pacientes frente a un grupo control sano. Se ha objetivado un porcentaje de células NK y de NK subtipo *dim* mayor en el grupo de sanos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,020$  y  $p=0,001$  respectivamente). Por otro lado destaca un mayor porcentaje de células NK subtipo *bright* en el grupo de pacientes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,010$ ). Destaca por último un mayor porcentaje de LT en el grupo de pacientes, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa.



**FIGURA 27.** Celularidad tras la expansión de células NK (% respecto a la celularidad absoluta +/- DE) en el grupo de pacientes y en el grupo de sanos.

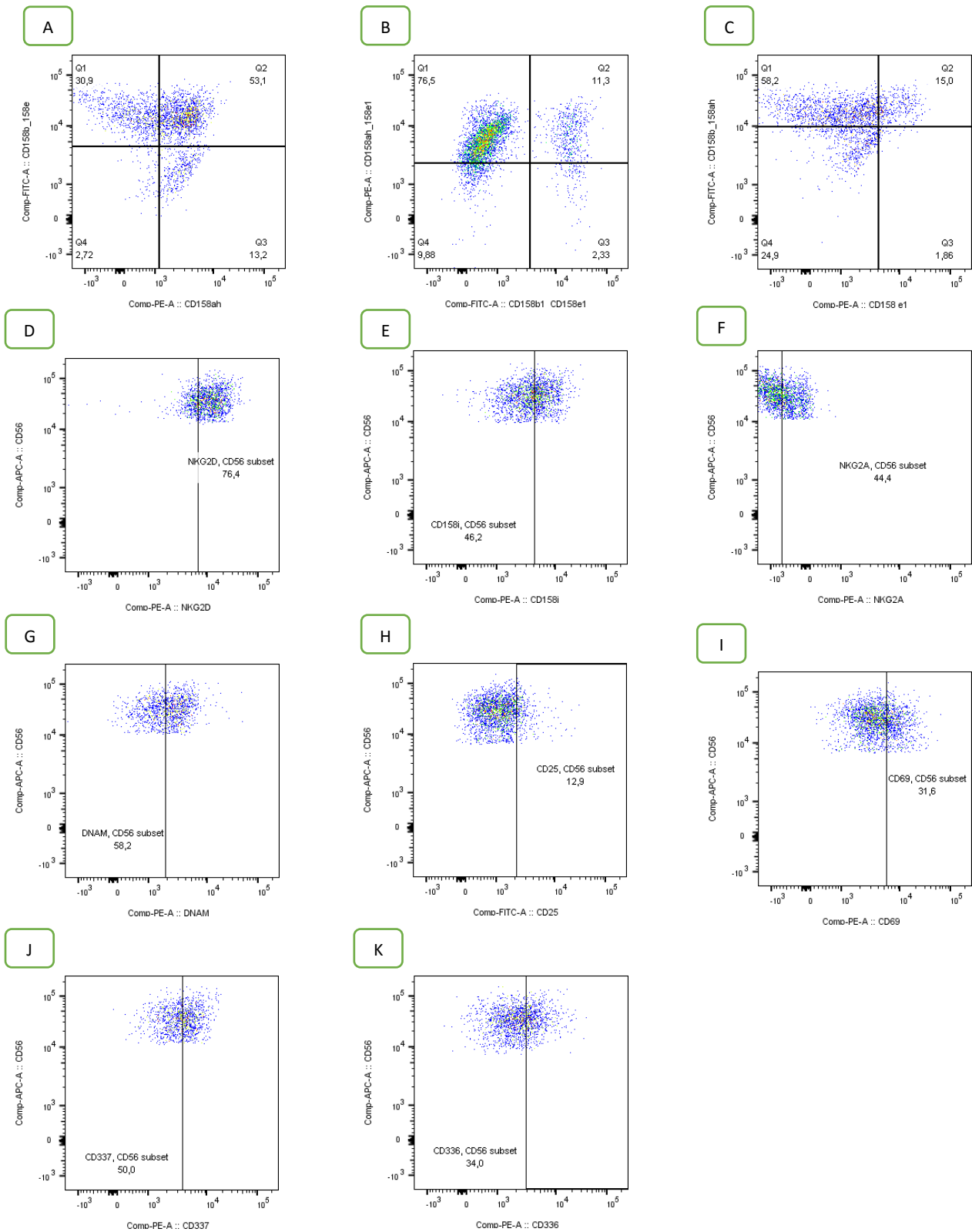
### 3.3 Fenotipo de las células NKA

#### 3.3.1 General (Figura 28, Figura 29 y Tabla 21 del ANEXO):

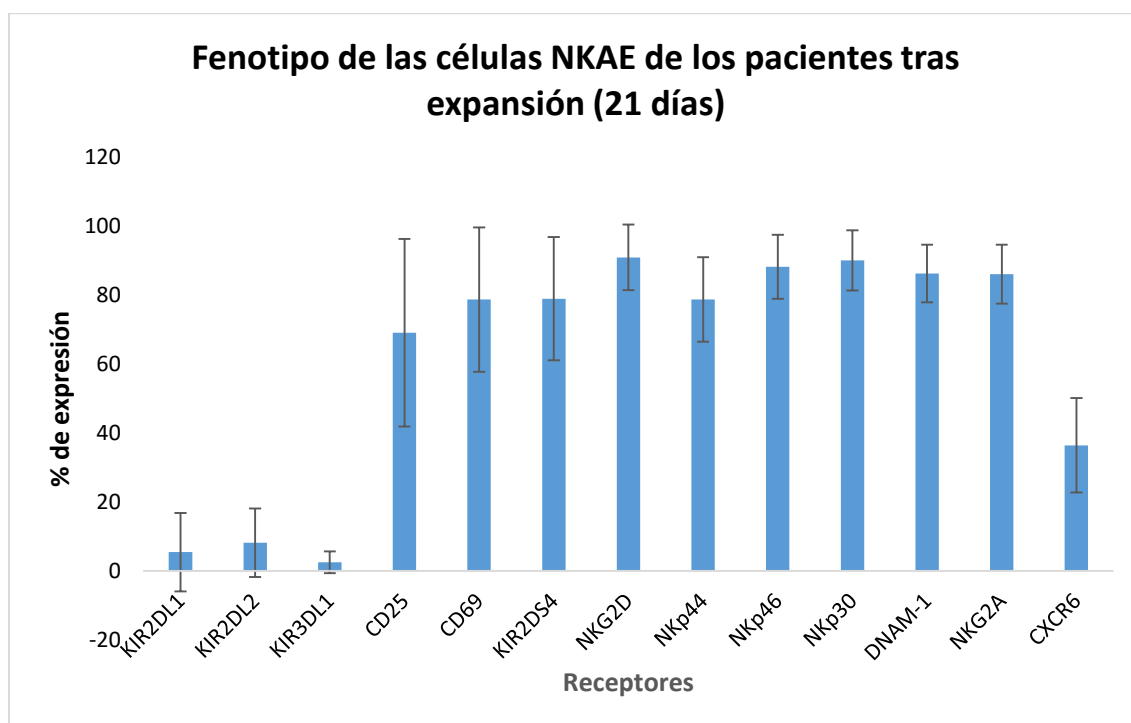
Se ha realizado la media del porcentaje de cada receptor/marcador de superficie de las células *NK* obtenidas al final de la expansión (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, CD25, CD69, KIR2DS4, NKG2D, NKp44, NKp46, NKp30, DNAM-1, NKG2A y CXCR6), de forma global en todo el conjunto de expansiones.

Se exponen, a modo de ejemplo, las imágenes de citometría de flujo del análisis de los receptores realizado a un paciente





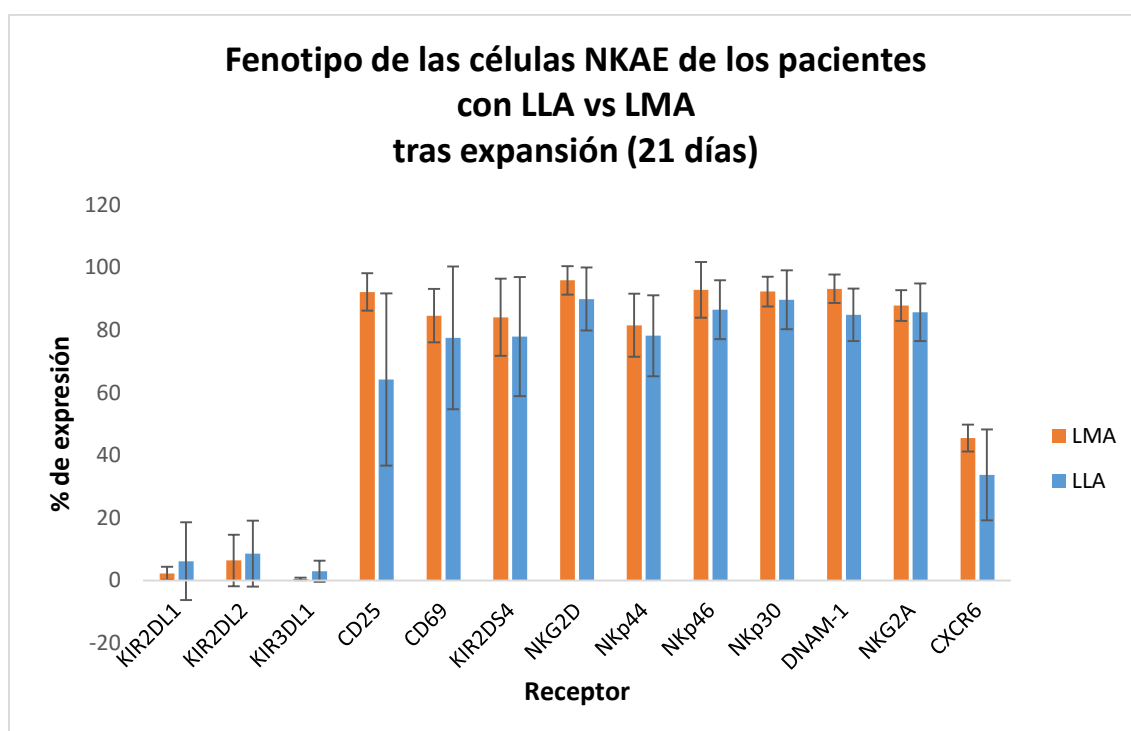
**FIGURA 28. Ejemplo de un paciente del estudio de los marcadores de superficie de las células NKAЕ mediante citometría de flujo.** A) KIR 2DL1. B) KIR 2DL2. C) KIR 3DL1. D) NKG2D. E) KIR 2DS4. F) NKG2A. G) DNAM. H) CD25. I) CD69. J) NKp30. K) NKp44



**FIGURA 29. Expresión de los marcadores de superficie (% de expresión +/- DE) de las células NKAЕ de los pacientes**

### 3.3.2 Estratificado en función del tipo de leucemia aguda (Figura 30 y Tabla 22 del Anexo):

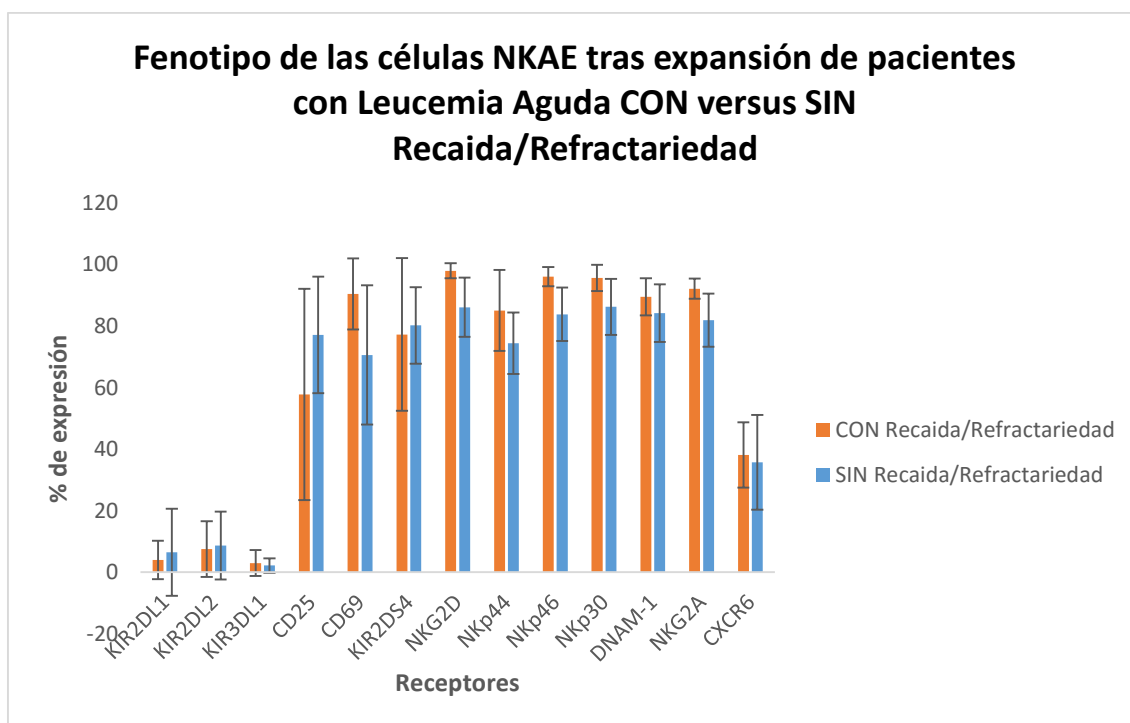
Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función del tipo de leucemia, y se realizado la media del porcentaje de cada receptor/marcador de superficie de las células NKAЕ obtenidas al final de la expansión, realizando una comparación entre ambos. Destaca una mayor expresión de KIR3DL1 en las LLA, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,032$ ). También destaca una mayor expresión de CD25 y DNAM-1 en las LMA, siendo estas diferencias no significativas pero cercanas a ello ( $p=0,059$  y  $p=0,078$  respectivamente).



**FIGURA 30.** Expresión de los marcadores de superficie (% de expresión +/- DE) de las células NKAЕ del grupo de pacientes con LMA y el grupo de pacientes con LLA

### 3.3.3 Estratificado en grupos en función del estado de la enfermedad (de “novo” versus recaída/refractoriedad) (Figura 31 y Tabla 23 del Anexo):

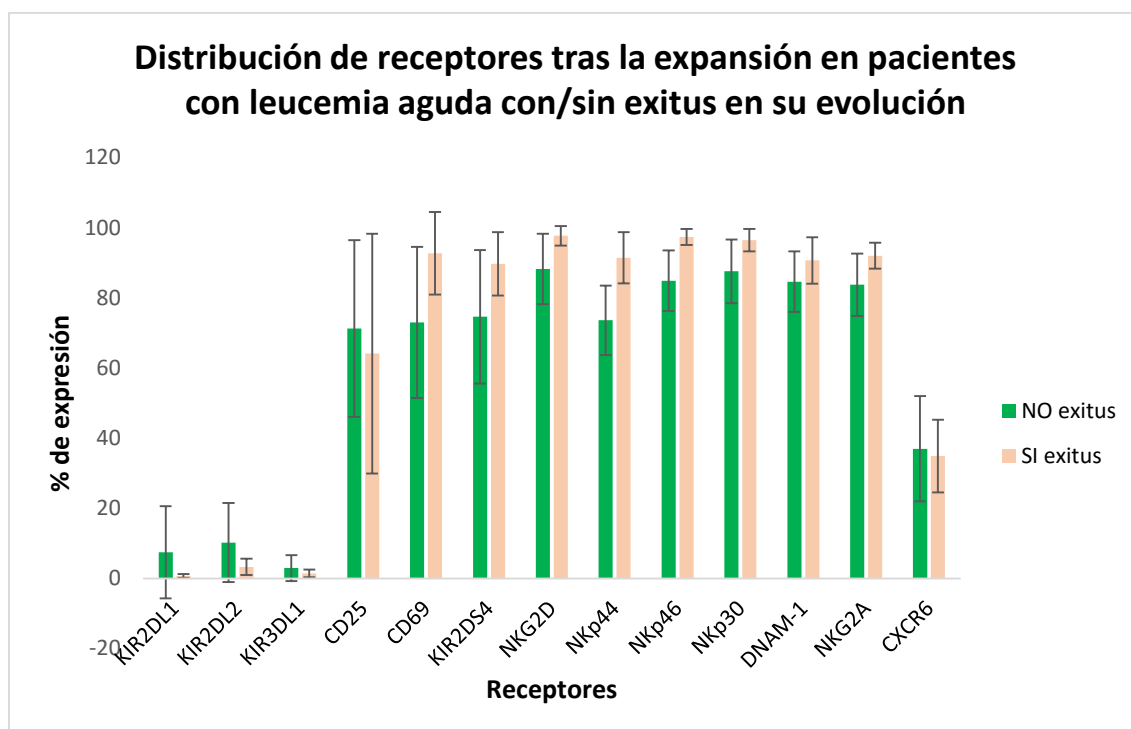
Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función del estado de la enfermedad, y se realizado la media del porcentaje de cada receptor/marcador de superficie de las células NKAЕ obtenidas al final de la expansión, realizando una comparación entre ambos. Se ha objetivado una mayor expresión en el grupo de enfermedad con recaída o refractoriedad de CD69, NKG2D, NKp46, NKp30 y NKG2A, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,03$ ,  $p=0,005$ ,  $p=0,047$ ,  $p=0,035$  y  $p=0,010$  respectivamente).



**FIGURA 31.** Expresión de los marcadores de superficie (% de expresión +/- DE) de las células NKAE del grupo de pacientes con recaída y/o refractariedad y el grupo de pacientes de nuevo diagnóstico

### 3.3.4 Estratificado en función de la evolución (exitus si/no) (Figura 32 y Tabla 24 del Anexo):

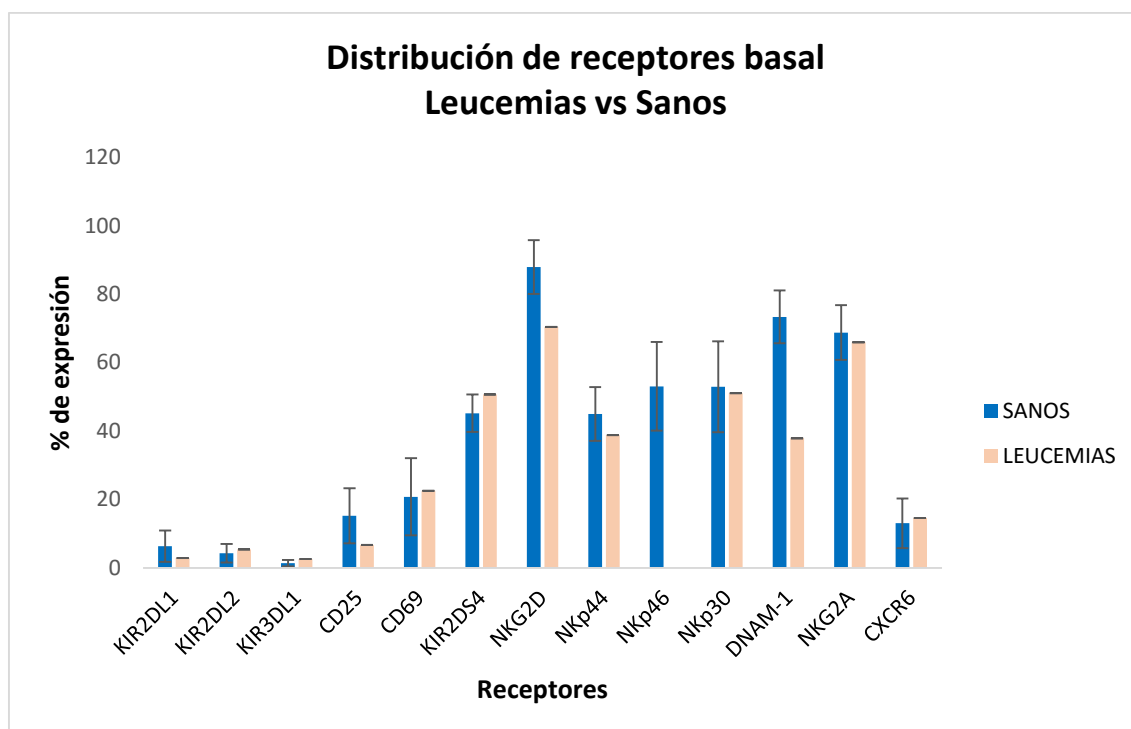
Se ha dividido a los pacientes en dos grupos, en función de la evolución de la enfermedad, y se realizado la media del porcentaje de cada receptor/marcador de superficie de las células NKAE obtenidas al final de la expansión, realizando una comparación entre ambos. Se ha objetivado una mayor expresión en el grupo de evolución a exitus de NKp44, NKp46 y NKG2A, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,016$ ,  $p=0,039$  y  $p=0,048$  respectivamente). Por otro lado también destaca en el grupo de evolución a exitus una mayor expresión de CD69 y NKG2D, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,066$  y  $p=0,09$  respectivamente) y una menor expresión de KIR2DL1, sin ser tampoco ésta última diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,09$ ).



**FIGURA 32.** Expresión de los marcadores de superficie (% de expresión +/- DE) de las células NKAE de los grupos de pacientes con y sin exitus en su evolución

### 3.3.5 Comparativa de la expresión basal de receptores de las células NK entre pacientes con LA y sanos (Figura 33 y Tabla 25 del Anexo):

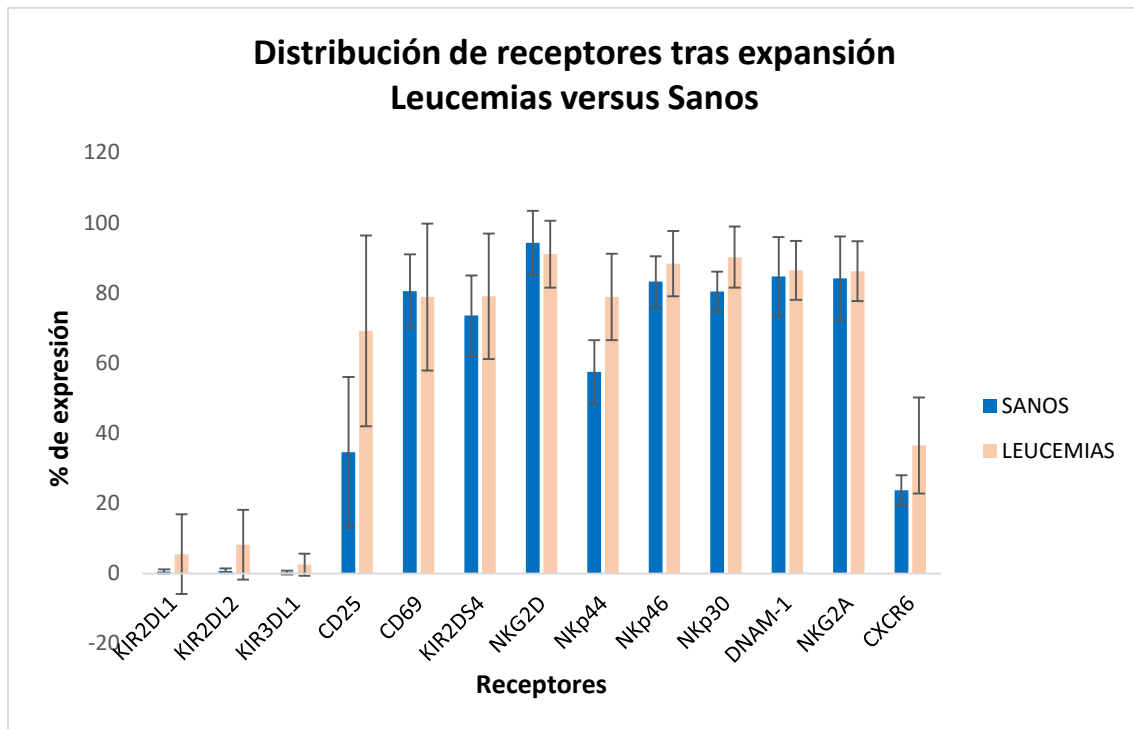
Se ha realizado la media del porcentaje de cada receptor/marcador de superficie de las células NK al inicio de la expansión en el grupo de pacientes y en el grupo control sano, y se han comparado ambos. Se ha objetivado una mayor expresión de DNAM-1, NKG2D y CD25 en el grupo control sano, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los dos primeros casos ( $p=0,004$  y  $p=0,028$  respectivamente) y no alcanzando la significación estadística en el último ( $p=0,062$ ).



**FIGURA 33.** Expresión de los marcadores de superficie (% de expresión +/- DE) de las células NK en situación basal en el grupo de pacientes con LA y el grupo control sano

### 3.3.6 Comparativa de la expresión tras la expansión de receptores de las células NK entre pacientes con LA y sanos (Figura 34 y Tabla 26 del Anexo):

Se ha realizado la media del porcentaje de cada receptor/marcador de superficie de las células NK al final de la expansión en el grupo de pacientes y en el grupo control sano, y se han comparado ambos. Destaca una mayor expresión de KIR2DL1, KIR2DL2, KIR3DL1, CD25, NKp44 y NKp30 en el grupo de pacientes con leucemia, siendo la diferencia estadísticamente significativa en todos los casos ( $p=0,036$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,007$ ,  $p=0,012$ ,  $p=0,003$  y  $p=0,006$  respectivamente).



**FIGURA 34.** Expresión de los marcadores de superficie (% de expresión +/- DE) de las células NKAE en situación basal en el grupo de pacientes con LA y el grupo control sano

#### 4. Estudios de funcionalidad

##### 4.1 Resumen de todos los pacientes de forma global:

Tabla 30 del Anexo

## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### **Interacción HLA-KIR en un modelo con identidad HLA y disparidad KIR (interacción entre donante y receptor en un TPH HLA idéntico)**

Este papel de las células NK en el escenario de la disparidad HLA ha sido constatado en diferente grado, con resultados variables en probable relación con las diferencias en la fuente de progenitores, los esquemas de acondicionamiento, heterogeneidad de patologías y tratamiento de soporte realizados en los distintos estudios publicados. No obstante, lo que planteamos aquí es poder valorar, con las limitaciones inherentes a nuestra cohorte y metodología, si en el escenario del TPH con identidad HLA las células NK pueden tener, asociado a la disparidad KIR que puede haber entre receptor y donante, un potencial papel terapéutico.

Esta parte de nuestro estudio se ha centrado en el análisis del haplotipo KIR y tipaje HLA en parejas de receptor-donante en los TPH HLA familiares idénticos realizados en uno de los centros colaboradores en los últimos 12 años, analizando la influencia y asociación de diversas variables en la evolución post-TPH.

#### **Genes KIR del donante**

Analizando la relación entre los genes KIR del donante con los eventos post-TPH observamos cómo algunos genes KIR activadores (KIR 2DL5 y KIR 2DS1) y un mayor número de células NK en la fase temprana de la reconstitución inmune se asocian con una mala evolución post-TPH

En el trabajo de *Triplet*<sup>55</sup> encontramos como en su cohorte, (que incluye pacientes con distintos grados de identidad HLA) la supervivencia post-TPH es mejor en aquellos receptores positivos para HLA-C2 cuyo donante carece del KIR activador 2DS1. Esa mejor evolución en la ausencia de este KIR activador es similar a lo encontrado en nuestro trabajo, no obstante, en nuestro caso no se ha determinado la relación de la presencia o ausencia de dicho KIR en el donante con la presencia o no de HLA-C2 en el receptor. En el estudio realizado por *Sullivan et al*<sup>76</sup> se incluye una cohorte de 244 pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica B o T. En ellos se analiza la relación de los genes KIR de manera independiente con la enfermedad mínima residual (EMR) tras el ciclo de quimioterapia de Inducción. El análisis se hace con los genes KIR estudiados a partir de DNA genómico y a partir de mRNA, realizando ambos con técnica de amplificación por PCR. Describen una asociación estadísticamente significativa en el primer grupo entre los genes KIR 2DL5 A, 2DS1 y 2DS3 y una EMR positiva tras la quimioterapia de Inducción, y en el segundo grupo entre los mRNA de KIR 2DS1 y una EMR positiva, y entre los mRNA de KIR 2DL1 y 2DL3 y una EMR negativa. Una explicación plausible propuesta para explicar

este fenómeno sería el hecho de que en el fenómeno de “licenciamiento” de las células NK, la presencia de los receptores KIR inhibidores son sumamente importantes para un posterior funcionamiento óptimo del *missing-self phenomenon*. Es más, se postula que cuanto mayor sea el número de receptores inhibidores KIR durante ese proceso de licenciamiento, más fuerte será la posterior respuesta citotóxica<sup>76</sup>. Como teoría complementaria a ésta se encuentra la del *Disarming model*, que postula que las células NK que exhiben mayor número de receptores activadores dejan de ser efectivas antes a lo largo del tiempo. Aunque este estudio esté realizado en pacientes sin trasplantar, las teorías que se exponen en el para explicar sus resultados podrían ser igualmente válidas para explicar en parte los resultados hallados en nuestra cohorte. Así pues, en los pacientes pediátricos con LLA la relación del genotipo y función de sus células NK con la evolución de la enfermedad podría explicarse en parte por lo descrito previamente. Los genotipos y fenotipos de células NK más activadores se asociarían con células NK que se han licenciado peor por una menor presencia de receptores KIR inhibidores y que funcionalmente son menos efectivos. En los pacientes que reciben un TPH HLA familiar idéntico, como es el caso de nuestra cohorte, el fenómeno de *missing-self phenomenon* no podría darse porque aunque pudiera existir una teórica disparidad HLA-KIR por el hecho de que son genes que se originan en cromosomas diferentes e independientes, esas células NK serían anérgicas, ya que no habrían experimentado el proceso de licenciamiento. Así pues en este escenario de identidad HLA la citotoxicidad de las células NK dependería teóricamente de la otra vía principal de citotoxicidad, el *induced-self phenomenon*. La peor evolución en los pacientes con presencia de dichos genes KIR 2DS1 y 2DL5 podría explicarse por una peor función de estas células NK de genotipo y fenotipo activador, y con ello peor citotoxicidad contra las células leucémicas que hubieran podido quedar tras el acondicionamiento. Pero también influiría otro factor, esas células NK de fenotipo activador, aunque sean hipofuncionantes, consumen recursos en su proliferación y expansión, que podría ser mayor que en los casos donde las células NK expresan un genotipo más inhibitor (haplotipo A). Esos recursos (IL-15 principalmente, y otras citoquinas) son un sustrato común en la expansión de otros subtipos de linfocitos durante el proceso de reconstitución inmune post-TPH.

El que las células NK con genotipo y fenotipo activador se expandan más implica que los linfocitos T, que tienen un demostrado papel en el proceso de injerto contra leucemia en el TPH HLA idéntico, dispondrían de una menor cantidad de IL-15 y otras citoquinas por esa competitividad de sustratos, lo que llevaría a una menor expansión de ellos, lo que implicaría unas cifras de linfocitos T menores en la reconstitución inmune temprana, y con ello un posible

menor efecto antileucemia global, ya que esas células NK activadoras expandidas a costa de una menor expansión de linfocitos T serían en realidad hipofuncionantes.

Los genes descritos en la bibliografía asociados a una peor evolución de la leucemia linfoblástica y descritos en nuestra serie como ligados a peor evolución post-TPH en nuestra cohorte de pacientes con leucemia aguda (linfoblástica y mieloblástica) son KIR 2DS1 y KIR 2DL5. Estos son genes teloméricos del haplotipo B, cuya presencia se relaciona de forma inversamente proporcional a la de ciertos genes KIR inhibidores como 3DL1. Este fenotipo se ha asociado a células NK de fenotipo más inmaduro.

Es interesante señalar además que la influencia de los genes KIR<sup>3</sup> no sólo se limita al hecho de si son genes activadores, definitorios del haplotipo B, o genes inhibidores, definitorios del haplotipo A. Se ha estudiado como la posición dentro del cromosoma donde se encuentran también influye en el fenotipo más o menos activador o inhibidor, definiéndose así en el haplotipo B los genes centroméricos 2DS2, 2DL2 y 2DL5b, y genes teloméricos 3DS1, 2DL5a y 2DS1. En cuanto al haplotipo A se define como gen centromérico el 2DL3, y como teloméricos 3DL1 y 2DS4. En función de la presencia o no de cada uno de estos genes, se han definido dentro del haplotipo B diferentes escalas que estratifican y dividen en subgrupos. Así vemos también como el estudio comparativo teniendo en cuenta los subgrupos dentro del haplotipo B definidos por dos escalas distintas, muestran una diferencia estadísticamente significativa en la probabilidad de recaída y de exitus post-TPH. Encontramos esa diferencia entre los grupos “0” y “3” de la escala propuesta por *Wing et al*, siendo peor la evolución post-TPH en el subgrupo “3”, que incluye mayor número de genes KIR activadores. Por otro lado, en el Score descrito por *Cooley*, también encontramos una diferencia estadísticamente significativa, con una mayor probabilidad de exitus y peor SLE post-TPH en el grupo *best*, que incluye más genes KIR activadores, frente al grupo *neutral*. Estos resultados son congruentes con los hallazgos encontrados en nuestra serie en la comparativa realizada incluyendo todos los genes KIR. Globalmente en nuestro trabajo, que incluye pacientes con LA a los que se les ha realizado un TPH HLA-idéntico con selección de CD34+ y con purgado *ex vivo* de linfocitos T, los resultados señalan que los genes y haplotipos más activadores en el donante parecen tener una influencia negativa en la evolución post-TPH.

No obstante, es importante señalar que la mayor parte de la bibliografía publicada apoya la hipótesis de que un mayor número de receptores KIR activadores en el donante se asocia a una mejor evolución post-TPH (por el efecto del *induced-self-phenomenom*).

En la revisión realizada por *Cooley et al*<sup>83</sup> se describe un estudio que incluye pacientes con LMA, de ellos 209 reciben un TPH HLA idéntico sin purgado de linfocitos T y 239 reciben un TPH no

idéntico sin purgado de linfocitos T. En el estudio encuentran una asociación significativa entre la presencia de un donante con haplotipo B con un aumento de la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad a los 3 años post-TPH. Se plantea en este trabajo que la disparidad HLA-KIR pudiera conferir beneficio en la evolución post-TPH en las leucemias agudas de estirpe mieloide sólo en el caso del purgado de linfocitos T.

En la revisión realizada por *Stringaris et al*<sup>84</sup> se incluyen 246 pacientes con hemopatías malignas diversas (LLA, LMA, LMC, SMD, LLC, LH y MM) que reciben un TPH familiar HLA idéntico con purgado de linfocitos T. La cohorte de este estudio se asemeja a la nuestra en que son pacientes que reciben un TPH familiar idéntico con purgado de linfocitos T, selección de células CD 34+ y que reciben ciclosporina en el período post-TPH inmediato. E igualmente es un análisis de DNA genómico.

Aquí se relaciona a los genes KIR 2DL5A, 2DS1 y 3DS1 en el donante con una tasa de recaída menor y una mejora de la supervivencia en pacientes con LMA de “novo”, pero no en otras formas de leucemia (estos tres genes se relacionan a su vez con una mayor número de células NK en el periodo post-TPH<sup>60</sup>). También se identifican en este estudio como factores predictores de la evolución post-TPH la cantidad de células CD 34+ y el número de linfocitos 30 días post-TPH.

Como conclusión en este apartado podemos afirmar que nuestros resultados sugieren, de forma congruente a gran cantidad de bibliografía publicada hasta la fecha, que el genotipo KIR del donante puede tener una influencia en la evolución post-TPH. Como se desarrolla más adelante, este posible papel de los genes KIR está sujeto a su vez a una serie de características del TPH en sí, identidad o no HLA, patología de base del paciente, acondicionamiento recibido, manipulación o no del injerto...siendo posible que el beneficio o no de un determinado haplotipo KIR pueda variar en función de toda esa serie de factores, por lo que es necesario realizar estudios con cohortes mucho más amplias donde se pueda realizar un análisis estratificado para determinar la influencia de los genes KIR del donante en cada una de las patologías y tipos de TPH.

### ***Mismatch* entre los receptores KIR inhibidores del donante y el HLA del paciente**

Debido a que los genes para los receptores KIR y el HLA se sitúan en cromosomas diferentes y se segregan de forma independiente, existe la teoría de que en el contexto de un TPH HLA idéntico, por la “tormenta” de citoquinas que acompaña al proceso, esos receptores KIR situados en células NK hipofuncionantes no licenciadas podrían activarse, favoreciendo el efecto antileucemia a través del *missing-self phenomenon*.

En la bibliografía se reconoce que, a pesar de numerosos estudios llevados a cabo por distintos grupos, todavía no se ha descrito un modelo que esté consensuado para predecir la alorreactividad KIR-HLA en el escenario del TPH HLA-idéntico, señalando además como la fuente de progenitores, el purgado o no de linfocitos T, la inmunosupresión farmacológica y otros factores relacionados con el TPH pueden influir en esa alorreactividad dentro de un mismo modelo de identidad HLA.

En nuestra cohorte no se ha objetivado una diferencia en la evolución post-TPH en los casos de disparidad KIR-HLA (presencia de KIR2DL1 en el donante y ausencia de HLA-C2 en el receptor, presencia de KIR2DL2/3 en el donante y ausencia de HLA-C1 en el receptor y presencia de KIR3DL1 en el donante y ausencia de HLA-Bw4 en el receptor).

En el trabajo llevado a cabo por *Savani et al*<sup>60</sup>, que incluye una cohorte de 157 pacientes con leucemia (LLA, LMA y LMC) que reciben un TPH familiar HLA idéntico con purgado de linfocitos T, tampoco encuentran una asociación entre la disparidad KIR-HLA entre donante y receptor y la evolución post-TPH. Curiosamente ellos encuentran una asociación entre el número de receptores KIR, ya sean activadores o inhibidores, y una evolución favorable post-TPH.

En otro estudio realizado por *Linn et al*<sup>54</sup> que incluye pacientes con diversas hemopatías (LLA, LMA, LMC y SMD) que reciben un TPH familiar HLA idéntico sin purgado de linfocitos T tampoco encuentran que la disparidad KIR-HLA en este escenario confiera beneficio en la evolución post-TPH, hallazgos similares a los descritos por otros autores<sup>85,86</sup>.

En el trabajo publicado por *Björklund et al*<sup>8</sup>, analizan una cohorte de 105 pacientes con hemopatías malignas que reciben un TPH familiar HLA-idéntico sin purgado de linfocitos T. En ellos realizan un análisis longitudinal del repertorio de células NK, a nivel fenotípico y funcional en el periodo post-TPH. Finalmente objetivan que existe una hiporrespuesta global de las células NK en el periodo temprano post-TPH, las células NK no “licenciadas” permanecen tolerantes durante el período temprano post-TPH (primeros 6 meses), ya que los requisitos para licenciarse siguen siendo válidos en ese momento y situación. Posteriormente y de forma paulatina van recuperando la función. Además, en este estudio comprueban que estos resultados son independientes del purgado o no de linfocitos T y del tratamiento inmunosupresor en el periodo post-TPH. Aunque hagan faltan más estudios, los resultados de éste sugieren que la inmunosupresión post-TPH no determina la cinética de transición de células NK *bright* a NK *dim*, así como tampoco la pérdida de la expresión de NKG2A y la adquisición paulatina de receptores KIR en el periodo post-TPH temprano.

No obstante, también encontramos en la bibliografía estudios con hallazgos opuestos a los anteriormente expuestos. En el estudio llevado a cabo por *Yu et al*<sup>58</sup> definen como en el periodo

temprano post-TPH, la población de células NK con disparidad KIR donante-HLA receptor presentan alorreactividad y capacidad funcional en el periodo inmediato post-TPH, para acabar adquiriendo tolerancia a los 3-6 meses post-TPH, hallazgo que no se relaciona en el estudio estadístico con la presencia del receptor NKG2A, los niveles de citoquinas post-TPH ni la presencia de los receptores NCR en las células NK, por lo que lo atribuyen específicamente a la alorreactividad por disparidad KIR-HLA. En el trabajo llevado a cabo por *Hsu et al*<sup>14</sup> en una cohorte similar a la nuestra se describe una asociación significativa entre la presencia de receptores KIR en el donante para los que existe ausencia del correspondiente ligando HLA en el paciente con una mejor evolución post-TPH. Y por último, en el estudio realizado por *Wang et al*<sup>17</sup> y en el llevado a cabo por *Kanga et al*<sup>56</sup> en pacientes con diversas hemopatías (LMA, LMC y SMD) que reciben un TPH familiar HLA idéntico sin purgado de linfocitos T también encuentran una mejor supervivencia global y supervivencia libre de eventos a los 2 años del TPH en las parejas donante-receptor con disparidad KIR-HLA.

Es importante subrayar que prácticamente todas las publicaciones señalan, en el conjunto de la identidad HLA, la potencial influencia en los resultados discordantes de factores del paciente, como la edad, la patología y el estadio de ésta en el momento del TPH, las diferencias en el proceso de acondicionamiento, el purgado o no de LT. En este último punto existen diversos estudios<sup>20 61 87,88</sup> donde se relaciona la ausencia de purgado de linfocitos T como un factor perjudicial para el desarrollo de la alorreactividad de las NK post-TPH y su efecto en la evolución posterior, y también existen publicaciones donde se señala el efecto perjudicial en la alorreactividad KIR-HLA en los TPH sin depleción de LT incluso en la no identidad HLA<sup>89</sup>.

Como conclusión en este apartado podemos afirmar que la bibliografía al respecto es extensa y contradictoria en muchos casos. La diversidad de resultados probablemente se deba a la inclusión de cohortes muy diversas, con patología muy heterogénea y mucha variabilidad respecto al acondicionamiento del TPH, tipo de donante, origen de los progenitores y disparidad genética entre paciente y donante.

#### **Número de células NK en la reconstitución inmune post-TPH**

En la reconstitución inmune post-TPH objetivada en nuestra cohorte, se puede apreciar como en cifras absolutas, se encuentra una diferencia en el número de células NK y linfocitos T en los primeros 3-6 meses post-TPH, siendo más marcada la diferencia en el día +60, en función del haplotipo del donante, con una mayor cifra de NK y menor de LT en los donantes con haplotipo B y viceversa en los donantes con haplotipo A.

La reconstitución inmune está influenciada por la presencia de LT en el inóculo<sup>78</sup>, ya que éstos influyen de manera directa, mediante la competencia por citoquinas como IL-7 o IL-15, que son necesarias para la homeostasis de ambos tipos celulares, y también de forma indirecta, por el microambiente hematopoyético post-TPH<sup>90,91</sup>, siendo la expansión y función de las células NK post-TPH mucho mejor con el purgado de linfocitos T<sup>14</sup>. Dado que en nuestra cohorte todos los pacientes reciben una selección de progenitores CD34+ con purgado de LT, la diferencia en este caso no podría justificarse por ese factor. Lo que si se ha visto en diversos estudios es que en el escenario de la identidad HLA, la cifra de células NK se recupera antes que la de LT y otros subtipos de linfocitos, con un fenotipo que se mantiene inmaduro (*bright*)<sup>92</sup> durante las primeras semanas con elevada expresión de CD94/NKG2A y baja expresión de receptores KIR, lo que conlleva a una citotoxicidad limitada. A las 4-6 semanas post-TPH se inicia la recuperación del repertorio KIR en el paciente<sup>15</sup>, proceso que tarda en completarse aproximadamente 6-9 meses, y que depende de la genética del donante, alcanzando repertorios finales similares a los de éste, con una influencia muy dudosa del HLA del receptor<sup>79</sup>. Con lo descrito, lo esperable es que el efecto antileucemia mediado por células NK ocurra tras ese lapso de mínimo 4 semanas post-TPH. Se generan clones alorreactivos durante los primeros 3 meses post-TPH, pero es en esa fase temprana cuando las células NK tienen potencialmente un papel crítico en el efecto contra el tumor y en el control de infecciones, mientras se reinstaura la inmunidad específica, que tarda algunas semanas o meses más<sup>93</sup>. Se ha descrito que los tiempos de recuperación de los KIR activadores e inhibidores como grupo son similares, siendo en el estudio realizado por *Triplett et al*<sup>55</sup> KIR2DS1 el más rápido y KIR3DL1 el más lento. Esa coordinación entre KIR activadores e inhibidores sugiere que existe una coordinación, incluso en el periodo post-TPH inmediato, para mantener un nivel apropiado de respuesta biológica de las células NK a los tejidos sanos y anómalos. Esa normalización de los receptores KIR se produce más rápido que la del receptor CD94/NKG2A, que se mantiene todavía algo elevado al final del primer año post-TPH. Se ha señalado<sup>8</sup> que esas células NK con fenotipo maduro NKG2A- KIR+ se mantienen tolerantes independientemente de la existencia o no de disparidad KIR-HLA y del purgado o no de LT. En cuanto a la presencia de receptores activadores en esas NK que surgen en el periodo post-TPH, se ha descrito una expresión elevada de NKp44 y NKp46 a pesar del fenotipo inmaduro que presentan los primeros meses<sup>55,94</sup>. En nuestro trabajo, al tratarse de un estudio retrospectivo, no ha sido posible realizar el estudio mediante citometría de flujo de los receptores presentes en las células NK presentes en la reconstitución inmune.

Existen por otro lado publicaciones con resultados opuestos a los nuestros, como el estudio En el estudio llevado a cabo por *Savani et al*<sup>60</sup>, donde encuentran una asociación entre la cifra de

células NK post-TPH (en el día +30 en su caso) y una mejor supervivencia, siendo este hallazgo significativo en el subgrupo de pacientes con LMA pero no en los que presentan LLA.

Hay que señalar que como limitaciones en nuestro estudio retrospectivo el hecho de tratarse de una cohorte pequeña, donde no se ha podido subanalizar por separado en los dos grandes subtipos de leucemia que aquí se incluyen (LMA y LLA) la influencia de dichos genes sobre la evolución post-TPH. Por otro lado, el estudio del haplotipo KIR se ha realizado sobre DNA genómico, no mRNA.

### **Interacción HLA-KIR en un modelo con identidad HLA sin disparidad KIR (paciente que no recibe TPH)**

#### **Fenotipo de los blastos**

En nuestro estudio se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de HLA-I y entre los cocientes ULBP1/HLA-I y ULBP2/HLA-I, siendo ambos menores en las leucemias agudas de estirpe linfóide (por una mayor expresión de HLA-I<sup>95</sup>). Estos hallazgos podrían explicar en parte el por qué las leucemias linfoblásticas son más resistentes a la terapia con células NK o porqué evolucionan peor que las mieloblásticas tras un TPH haploidentico. La ausencia de HLA-I permite a las células NK activarse a través del *missing-self phenomenon*. Si por el contrario la célula tumoral expresa este ligando en gran cantidad, de alguna manera se “escapa” a ese sistema inmune innato, y se pierde el principal estímulo de activación de las células NK. En un estudio realizado por *Lang et al*<sup>96</sup> revisan, en una cohorte de 21 pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, las diferencias en la citotoxicidad *in vitro* mediada por las células NK en función del grado de expresión de HLA-I por parte de los blastos leucémicos y del KIR *mismatch*. Tras los experimentos concluyen que la combinación del grado de expresión de HLA-I y la presencia o ausencia de KIR *mismatch* podrían explicar más del 85% de los patrones de lisis encontrados, siendo esta mayor cuanto menor es el grado de expresión del HLA-I y cuanto mayor *mismatch* existe. También se objetiva que el KIR-*mismatch* influye de forma más relevante a la lisis en los pacientes con alta expresión de HLA-I. Estos resultados son muy interesantes para intentar optimizar distintas líneas terapéuticas. Por ejemplo, podría realizarse una medición de la expresión de HLA-I en los blastos y del KIR-ligando *mismatch* en los pacientes con LLA de estirpe B que reciben un TPH con purgado de células T, para poder así seleccionar aquellos potenciales candidatos para beneficiarse de infusiones de células NK estimuladas en el periodo post-TPH.

En cuanto al ligando CD155, vemos en nuestros resultados como su disminución está asociada a una peor situación de la enfermedad y evolución. Estos hallazgos son congruentes con lo



descrito en la bibliografía acerca del papel de dicho ligando, cuya expresión está regulada por el estrés genotóxico y ciertos agentes terapéuticos, expresándose en muchos tumores sólidos y hematológicos<sup>11</sup>. Se ha demostrado la resistencia a la lisis mediada por células NK de ciertas hemopatías que no lo expresan<sup>95</sup>, como la LMA subtipo M7. Los principales receptores descritos hasta la fecha para este ligando<sup>11</sup> son: CD226 (DNAM-1) y CD96. Estos receptores compiten en su unión a este ligando, desencadenando además un efecto opuesto con su unión al mismo. La unión de CD155 con CD96 produce una inhibición de las células NK, mediante una disminución en la producción de citoquinas, mientras que su unión con CD226 induce una activación de las mismas, y esta última unión es la que tiene un papel dominante *in vivo*. Dado que su unión con CD226 activa a la célula NK, tiene sentido lo objetivado en nuestro estudio, es decir, que en los pacientes que presentan peor evolución este ligando se expresa en menor cantidad, hecho que puede relacionarse con una menor activación de las células NK en ese organismo y menor efecto antitumoral de las mismas. Se ha visto así mismo que la expresión de CD226 con frecuencia está disminuida en la superficie de los linfocitos citotóxicos de los pacientes con cáncer<sup>97</sup>. Por otro lado también se ha descrito como CD155 y CD112 (ligandos de CD226) representan un papel tan importante en la lisis de las células tumorales por parte de las NK que podrían utilizarse como biomarcadores que nos permitan identificar aquellas leucemias susceptibles de ser tratadas de forma complementaria a los tratamientos convencionales con inmunoterapia basada en células NK<sup>95</sup>.

En relación a ULBP4<sup>21</sup> se sabe que es un ligando para el receptor activador NKG2D de la célula NK, y tras su unión se incrementa la capacidad citotóxica de la misma. Los principales ligandos para este receptor son la familia ULBP y la familia MIC, siendo ambas grupos de moléculas de MHC clase I codificadas en el cromosoma 6. Ambas familias contienen moléculas cuya expresión está inducida por el estrés celular, y por lo tanto se expresan principalmente en la superficie de células infectadas o que han sufrido un proceso de transformación tumoral<sup>22,23</sup>. De hecho, se ha postulado que los ligandos de NKG2D pudieran servir como marcadores tumorales para posibles estrategias de inmunoterapia, posibilitando el marcaje de las células tumorales para su destrucción por parte del sistema inmune<sup>21</sup>. Así pues, el resultado objetivado en nuestro estudio es congruente con la bibliografía existente, ya que hemos visto en nuestra cohorte que una mayor expresión por parte de los blastos leucémicos de nuestros pacientes presenta una asociación estadísticamente significativa con una mejor situación basal de la enfermedad y posterior evolución.

En la comparativa de expresión de ligandos en médula ósea entre nuestros pacientes con leucemia y el **control sano**, a diferencia de lo descrito en la bibliografía<sup>98</sup>, hemos observado mayor expresión (no estadísticamente significativo) de todos los ligandos excepto CD155<sup>9</sup>.

Como limitación en nuestro trabajo es necesario señalar que, por el tamaño de la muestra no se ha podido estudiar si existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los ligandos en función de las variantes inmunofenotípicas dentro de cada grupo de leucemias agudas, ni de las alteraciones citogenéticas o de biología molecular. Sería imprescindible repetir esta comparativa con grupos mucho más numerosos que los utilizados aquí para poder extraer conclusiones más concluyentes. Esto podría ser de mucha utilidad ya que conocer que patrones de leucemia, en función de su estirpe y de sus alteraciones citogenéticas y de biología molecular, podrían tener mayor sensibilidad a la lisis por células NK, permitiría plantear una terapia complementaria a su tratamiento convencional de forma más precoz en aquellos pacientes que sabemos que pueden ser más sensibles a la citotoxicidad mediada por estas células.

### Genotipo KIR

Nuestros resultados en cuanto a la relación de genes KIR y la evolución de la enfermedad no coinciden en su mayor parte con los descritos en la bibliografía<sup>76</sup>. Esto podría deberse a distintos motivos, entre los que cabe destacar el reducido tamaño del grupo de estudio.

Es interesante el hallazgo, a pesar del tamaño limitado de la muestra, de una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del gen KIR 2DS4 (*inv*) y la evolución (exitus) y una asociación cercana a la significación estadística entre su presencia y una peor situación de la enfermedad. Este gen, a pesar de codificar un KIR activador, forma parte del haplotipo A, y presenta con frecuencia una delección de 22 pb en el exón 5, codificando en esos casos un receptor no funcional<sup>20 99</sup>. En un estudio reciente<sup>100</sup>, realizado en población china, encuentran una diferencia estadísticamente significativa en la presencia del gen 2DS4 entre pacientes con leucemia mieloide crónica y controles sanos, siendo mayor en el primer grupo.

Existe gran controversia en la bibliografía reciente sobre la posible asociación de ciertos genes KIR con una mayor o menor predisposición al desarrollo de leucemias agudas en los niños. Ciertos trabajos llevados a cabo, como por ejemplo el publicado por *Almalte et al*<sup>99</sup>, encuentran una presencia mucho menor de los genes KIR activadores en los paciente pediátricos con leucemia linfoblástica aguda respecto a una población control. No existe análisis de los genes KIR inhibidores en este estudio. Por otro lado, otros trabajos, como el llevado a cabo por *Babor et al*<sup>101</sup> analizan la presencia de los genes KIR activadores e inhibidores en pacientes pediátricos

con leucemia linfoblástica aguda (B y T) y lo comparan con una población sana, sin encontrar ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Alguna de las posibles causas alegadas por los distintos autores para explicar las discrepancias en los diferentes estudios son las diferencias étnicas, la técnica de PCR en sí e incluso el posible deterioro de aquellas muestras conservadas en biobancos por tiempos prolongados.

### **Proceso de expansión y activación de las células NK**

La estrategia llevada a cabo en nuestro trabajo para expandir las células NK es muy similar a la utilizada en numerosos trabajos descritos en la bibliografía<sup>102</sup>, aunque existen otras técnicas de expansión descritas en la literatura<sup>103</sup>. En nuestro trabajo, en la mayoría de casos ha habido un aumento del porcentaje y celularidad global de células NK, pero la dinámica de las expansiones como tal es algo errática. Ello puede deberse en parte a que esas células mononucleares de las que parte de la expansión pertenecen a pacientes con diagnóstico de hemopatía maligna en el momento del diagnóstico, estando el número y capacidad funcional de esas células NK basales disminuido en muchos casos. Nuestra serie por otra parte es muy pequeña, siendo evidente que se necesitarían grupos de pacientes mucho más amplios con características homogéneas para poder intentar definir patrones de expansión.

### **Celularidad y fenotipo de las células NK y NKAE**

Analizando los resultados de la comparativa entre el grupo de pacientes y los controles sanos, se han objetivado diferencias en la celularidad basal entre ambos grupos. En la bibliografía se han descrito hallazgos similares, en concreto comparando pacientes con LMA y sanos. En el estudio realizado por Szczepanski et al<sup>104</sup> objetivan que el porcentaje total de células NK circulantes es menor en el grupo de pacientes respecto a los controles sanos, siendo además la cantidad relativa de NK *dim* más baja y de NK *bright* más alta en el primer grupo, hallazgos similares a los nuestros, aunque nuestra cohorte de enfermos incluye principalmente pacientes con LLA. Ese aumento del subtipo *bright* podría deberse a un cambio en el microambiente de citoquinas que acompaña a la generación y progresión de un tumor.

En el estudio del fenotipo de las células NK en situación basal, hemos encontrado en nuestra cohorte una menor expresión de DNAM y NKG2D en los pacientes con leucemia aguda respecto al control de sanos. Estos resultados podrían ser congruentes con ciertos hallazgos descritos en la bibliografía en los que se describe como las células NK al diagnóstico en los pacientes con ciertas hemopatías se hallan disminuidas en número y grado de activación. En el estudio

publicado por *Szczepanski et al*<sup>104</sup> objetivan una menor expresión basal del receptor NKG2D en un grupo de pacientes con LMA frente a un grupo control sano.

En el estudio del fenotipo de las células NK tras el proceso de expansión y activación, se han encontrado una serie de diferencias. Nuestros hallazgos indican que los pacientes con peor situación de la enfermedad, aquellos que evolucionan peor e incluso el grupo de pacientes con leucemia frente al grupo de controles sanos expresan en mayor cantidad receptores activadores del grupo NCR (NKp46, NKp44, NKp30). Se ha descrito en la literatura<sup>24</sup> como las células tumorales pueden utilizar estos receptores NCR para escapar al reconocimiento por parte de la célula NK. Tras la unión a estos receptores, las células tumorales pueden inducir la muerte celular de la célula NK a través de una apoptosis mediada por Fas. Por otro lado, las células tumorales pueden también inducir la expresión de exosomas con antígeno nuclear de proliferación celular, los cuales, al contactar con el receptor NCR expresado en las células NK inhibiría su función. Esto ilustra en parte los mecanismos de escape que utilizan las células tumorales frente a aquellas células NK que se han activado para combatir las, siendo en estos casos ineficaz el aumento de ciertos receptores activadores en la superficie de las mismas<sup>105</sup>. En cuanto a NKG2A, está descrito en la bibliografía como, en leucemias agudas mieloblásticas, su expresión elevada en las células NK al diagnóstico de la leucemia se asocia con una menor producción de FNT-alfa y peor respuesta a la quimioterapia, con menor tasa de remisiones completas. Se ha sugerido por tanto que podría tratarse de un nuevo biomarcador para la respuesta a la quimioterapia<sup>105</sup>. Estos hallazgos serían congruentes con nuestros resultados, en los que hemos observado una mayor expresión de NKG2A en aquellos pacientes de nuestra cohorte que presentaban una peor situación de la enfermedad en el momento del estudio y en aquellos que posteriormente han evolucionado a exitus. Acerca de CD69, se sabe que las células NK lo expresan como respuesta a la estimulación por ciertas citoquinas, por lo que el hecho de que se encuentre aumentado en los pacientes con una peor situación en el momento del estudio podría justificarse por el hecho de que son pacientes donde persiste un mayor estado proinflamatorio, activador, con un sistema inmune crónicamente activado pero malfuncionante<sup>28</sup>.

Como conclusiones en este apartado es importante reseñar la dinámica constante que existe entre receptores de células del sistema inmune y sus correspondientes ligandos en las células tumorales, con cambios constantes en la expresión de ambos, que dependen de múltiples factores (genética, tratamientos recibidos) y que determinan en parte la evolución de la enfermedad en cada paciente. En el trabajo realizado por *Moretta et al*<sup>15</sup>, describen un fenómeno en tumores sólidos que podría ser aplicable a nuestra situación, aunque en nuestro

caso se trate de hemopatías malignas. Las células NK en contacto continuado con células tumorales o inflamatorias presentan una estimulación continuada a través de los receptores activadores, pero esa activación constante a través de las células tumorales y del microambiente tumoral, acaba conduciendo a la célula a un estado de anergia.

## **Uso terapéutico de las células NK**

### **Citotoxicidad basal de las células NK en pacientes y sanos.**

En nuestra cohorte, por disponibilidad de muestras, ha sido imposible el comparar la citotoxicidad basal de las células NK de pacientes con LA con la de controles sanos. Existe bibliografía que relaciona una menor citotoxicidad basal con una mayor predisposición a padecer este tipo de enfermedades. Así, *Imai et al*<sup>106</sup> publicaron un estudio donde comparan la citotoxicidad en ambos grupos dentro de una amplia cohorte seguida a los largo de más de 10 años. Ellos describen que los individuos sanos con una citotoxicidad baja poseen un riesgo significativamente mayor de padecer cáncer. Señalan que aunque tan sólo un 30% de la citotoxicidad es atribuible a factores de estilo de vida, la citotoxicidad podría considerarse un biomarcador para indicar intervención en esos hábitos de vida dentro de las estrategias de prevención del cáncer. En otro trabajo de *Viel et al*<sup>107</sup> se señala cómo la actividad de las células NK se encuentra disminuida en los pacientes con cáncer (ellos lo estudian en pacientes que ya presentan la enfermedad, no como biomarcador). Postulan que son mediadores producidos por el propio tumor los que regulan negativamente la actividad de las células NK, inhibiendo además su maduración. Estos autores proponen la potencial utilidad de realizar estudio de citotoxicidad en pacientes con hemopatías malignas para valorar su posible valor pronóstico, de forma similar al *inmunoscore* realizado a los pacientes afectados de cáncer de colon, ya descrito por otros autores<sup>108</sup>. La ventaja de las hemopatías es que el tejido tumoral es fácilmente accesible, y la manera de monitorizar la inmunobiología de las células NK en estos pacientes puede hacerse con citometría de flujo (potencial citotóxico, capacidad de secreción de citoquinas, estado de activación y su nivel de expresión de receptores activadores e inhibidores). En la Tabla 31 del ANEXO se exponen los parámetros propuestos por estos autores que sería útil estudiar por citometría de flujo, para valorar los distintos aspectos de la función y estado madurativo de la célula NK.

### **Citotoxicidad de las células NKAE frente a blastos autólogos**

En cuanto a la citotoxicidad *in vitro* de las células NKAE frente a los blastos autólogos, en todos los pacientes de nuestro estudio los resultados no han sido satisfactorios, sin objetivar una citotoxicidad adecuada en ningún caso. De forma congruente con nuestros resultados, en el

estudio realizado por *Stringaris et al*<sup>105</sup>, objetivan que los blastos (de LMA en este caso) elevan de forma constitutiva una serie de factores solubles (entre los que se ha identificado IL-10) capaces de interferir con la función de las células NK, haciendo que éstas tengan una producción de citoquinas disminuida, siendo estos hallazgos similares en los distintos subtipos de células NK con distinta expresión de receptores KIR. En el estudio se describe como el grado de esta citotoxicidad disminuida al diagnóstico podría ser otro factor pronóstico de la respuesta. En otro estudio publicado por *Mirosław et al*<sup>104</sup> objetivan que las células NK circulantes en pacientes con LMA al diagnóstico presentan una citotoxicidad y producción de citoquinas disminuida, y también relacionan esa funcionalidad con la supervivencia libre de eventos. Aunque los mecanismos moleculares responsables de la disminución en la expresión de esos receptores activadores *in vivo* en los pacientes con LMA no están completamente dilucidados, parece que una cantidad elevada de los ligandos de esos receptores de forma soluble en el suero, producida por las propias células tumorales, podría provocar una disminución de esos receptores, y consecuentemente de la actividad. Por último, en otro estudio que incluye pacientes pediátricos con LLA<sup>39</sup> también comprueban como la actividad de las células NK de los pacientes en “fresco”, sin manipular, es insuficiente para eliminar a los blastos. En este trabajo se demuestra que el papel de DNAM-1 al interactuar con sus correspondientes ligandos es más crucial en la lisis de los blastos leucémicos que NKG2D.

No obstante también existen numerosos estudios en la bibliografía de citotoxicidad de células NK frente a blastos autólogos, con resultados positivos, como los llevados a cabo por *Sieger et al*<sup>109</sup> y *Torelli et al*<sup>45</sup> en adultos. En niños en los últimos años se han llevado a cabo varios proyectos con resultados muy prometedores, como los publicados por *Rubnitz et al*<sup>110-113</sup>.

Aunque es importante tener en cuenta el tamaño de nuestra muestra para interpretar los resultados, si se pueda intuir que aunque esas células NK puedan llegar a ser, tras la estimulación adecuada, funcionales frente a diversas líneas celulares, es posible que las células leucémicas bloqueen en diverso grado su capacidad citotóxica, a través de moléculas presentes en la propia célula y a través de factores solubles presentes en el suero del paciente. Por tanto, si se pretende una terapia autóloga con infusión de células NKAE, es posible que haga falta algún mecanismo añadido además de activarlas *in vitro*, como por ejemplo el administrar fármacos que aumenten todavía más la actividad de estas células *in vivo*<sup>42, 114-116</sup> (IL-2, IL-15 etc.) o que sensibilicen a los blastos *in vivo*<sup>117</sup> (Tabla 1 del Anexo).

Señalar por último que también existen numerosas publicaciones acerca de las infusiones de células NK tras la realización de un TPH, tanto en población adulta (*Nguyen et al*<sup>118</sup>) como en población pediátrica (*Koehl et al*<sup>119</sup>).

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos nos llevan a concluir lo siguiente:

1. El genotipo KIR B en el donante conlleva un peor resultado en el seno del TPH alogénico HLA idéntico y la causa más probable es debido a su expansión competitiva, que limita el desarrollo de linfocitos T antileucémicos en la reconstitución inmune post-TPH.
2. Un fenotipo más activador e inmaduro de la célula NK se asocia a una peor evolución del paciente con leucemia aguda no trasplantado. Ello podría deberse a la hipofunción que conlleva el estímulo activador de forma mantenida en la célula NK (*Disarming model*).
3. Las células NK de los pacientes con leucemias agudas experimentan un cambio en su fenotipo y capacidad citotóxica frente a líneas celulares comerciales tras un proceso de expansión *in vitro*, sin haber podido demostrar un aumento de la citotoxicidad frente a las células propias de su enfermedad (de forma autóloga en cada caso). Esto posiblemente se explica por la presencia de factores solubles y en la superficie de las células leucémicas capaces de inhibir la citotoxicidad de las células NK.



## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Ruggeri, L. *et al.* NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood cells, molecules & diseases* **40**, 84-90 (2008).
- 2 Rubnitz, J. E. *et al.* Natural killer cell therapy in children with relapsed leukemia. *Pediatric blood & cancer* (2015).
- 3 Leung, W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 3390-3400 (2014).
- 4 Miller, J. S. Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2013**, 247-253 (2013).
- 5 Vivier, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44-49 (2011).
- 6 Campbell, K. S. & Hasegawa, J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *The Journal of allergy and clinical immunology* **132**, 536-544 (2013).
- 7 Shereck, E., Satwani, P., Morris, E. & Cairo, M. S. Human natural killer cells in health and disease. *Pediatric blood & cancer* **49**, 615-623 (2007).
- 8 Bjorklund, A. T. *et al.* NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation. *Blood* **115**, 2686-2694 (2010).
- 9 Mandal, A. & Viswanathan, C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/oncology and stem cell therapy* (2014).
- 10 Sun, J. C. *et al.* Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *The Journal of experimental medicine* **209**, 947-954 (2012).
- 11 Chan, C. J. *et al.* The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nature immunology* **15**, 431-438 (2014).
- 12 Raulet, D. H. & Vance, R. E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature reviews. Immunology* **6**, 520-531 (2006).
- 13 Lanier, L. L. NK cell receptors. *Annual review of immunology* **16**, 359-393 (1998).
- 14 Hsu, K. C. *et al.* Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* **105**, 4878-4884 (2005).
- 15 Moretta, L. *et al.* Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. *Frontiers in immunology* **5**, 87 (2014).
- 16 Cerwenka, A. & Lanier, L. L. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunological reviews* **181**, 158-169 (2001).
- 17 Wang, H. *et al.* The impact of recipient HLA-Cw and donor killer immunoglobulin-like receptor genotyping on the outcome of patients receiving HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancies. *Swiss medical weekly* **143**, w13717 (2013).
- 18 Eissens, D. N. *et al.* Selective expansion of human natural killer cells leads to enhanced alloreactivity. *Cellular & molecular immunology* **11**, 160-168 (2014).
- 19 Babor, F., Fischer, J. C. & Uhrberg, M. The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. *Frontiers in immunology* **4**, 27 (2013).
- 20 Clausen, J. *et al.* The role of missing killer cell immunoglobulin-like receptor ligands in T cell replete peripheral blood stem cell transplantation from HLA-identical siblings. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **16**, 273-280 (2010).

- 21 Cerwenka, A. & Lanier, L. L. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue antigens* **61**, 335-343 (2003).
- 22 Salih, H. R., Rammensee, H. G. & Steinle, A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* **169**, 4098-4102 (2002).
- 23 Groh, V., Wu, J., Yee, C. & Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734-738 (2002).
- 24 Horton, N. C. & Mathew, P. A. Nkp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors. *Frontiers in immunology* **6**, 31 (2015).
- 25 Chan, C. J., Andrews, D. M. & Smyth, M. J. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Current opinion in immunology* **24**, 246-251 (2012).
- 26 Nagumo, Y. *et al.* Increased CD112 expression in methylcholanthrene-induced tumors in CD155-deficient mice. *PloS one* **9**, e112415 (2014).
- 27 Borrego, F., Robertson, M. J., Ritz, J., Pena, J. & Solana, R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* **97**, 159-165 (1999).
- 28 Mohammadi Nejad, M. *et al.* Increased expression of CD69 antigen on human peripheral blood natural killer cells in patients with allergic rhinitis. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology* **12**, 68-74 (2013).
- 29 Ljunggren, H. G. & Malmberg, K. J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature reviews. Immunology* **7**, 329-339 (2007).
- 30 Skak, K., Frederiksen, K. S. & Lundsgaard, D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* **123**, 575-583 (2008).
- 31 Hamerman, J. A., Ogasawara, K. & Lanier, L. L. NK cells in innate immunity. *Current opinion in immunology* **17**, 29-35 (2005).
- 32 Lee, S. C., Srivastava, R. M., Lopez-Albaitero, A., Ferrone, S. & Ferris, R. L. Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunologic research* **50**, 248-254 (2011).
- 33 Chiang, S. C. *et al.* Comparison of primary human cytotoxic T-cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production. *Blood* **121**, 1345-1356 (2013).
- 34 Raulet, D. H. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Seminars in immunology* **18**, 145-150 (2006).
- 35 Leung, W. *et al.* Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* **172**, 644-650 (2004).
- 36 Kim, S. *et al.* Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* **436**, 709-713 (2005).
- 37 Enqvist, M. *et al.* Coordinated Expression of DNAM-1 and LFA-1 in Educated NK Cells. *J Immunol* **194**, 4518-4527 (2015).
- 38 Joncker, N. T. & Raulet, D. H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunological reviews* **224**, 85-97 (2008).
- 39 Torelli, G. F. *et al.* Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells. *Haematologica* **99**, 1248-1254 (2014).
- 40 Jardine, L. *et al.* Sensitizing primary acute lymphoblastic leukemia to natural killer cell recognition by induction of NKG2D ligands. *Leukemia & lymphoma* **54**, 167-173 (2013).
- 41 Perez Martinez, A. *et al.* [Twenty years of treating childhood acute lymphoblastic leukemia]. *An Pediatr (Barc)* **65**, 198-204 (2006).

- 42 Schirrmann, T. & Pecher, G. Specific targeting of CD33(+) leukemia cells by a natural killer cell line modified with a chimeric receptor. *Leukemia research* **29**, 301-306 (2005).
- 43 Cooper, L. J. Persuading natural killer cells to eliminate bad B cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 4790-4791 (2009).
- 44 Chang, Y. H. *et al.* A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer research* **73**, 1777-1786 (2013).
- 45 Torelli, G. F. *et al.* Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica* **90**, 785-792 (2005).
- 46 Geller, M. A. & Miller, J. S. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **3**, 1445-1459 (2011).
- 47 Tanaka, J. *et al.* Expansion of NK cells from cord blood with antileukemic activity using GMP-compliant substances without feeder cells. *Leukemia* **26**, 1149-1152 (2012).
- 48 Leung, W. Use of NK cell activity in cure by transplant. *British journal of haematology* **155**, 14-29 (2011).
- 49 Foley, B. *et al.* The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation (HCT). *Immunological reviews* **258**, 45-63 (2014).
- 50 Bignon, J. D. & Gagne, K. KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Current opinion in immunology* **17**, 553-559 (2005).
- 51 Scquizzato, E. *et al.* KIR/HLA-I mismatching and risk of relapse in paediatric patients undergoing non-haploidentical allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric transplantation* **15**, 198-204 (2011).
- 52 McQueen, K. L. *et al.* Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Human immunology* **68**, 309-323 (2007).
- 53 Dou, L. P. *et al.* The diversity of KIR gene in Chinese Northern Han population and the impact of donor KIR and patient HLA genotypes on outcome following HLA-identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancy in Chinese people. *International journal of hematology* **87**, 422-433 (2008).
- 54 Linn, Y. C. *et al.* Effect of missing killer-immunoglobulin-like receptor ligand in recipients undergoing HLA full matched, non-T-depleted sibling donor transplantation: a single institution experience of 151 Asian patients. *Bone marrow transplantation* **45**, 1031-1037 (2010).
- 55 Triplett, B. M. *et al.* Effects of activating NK cell receptor expression and NK cell reconstitution on the outcomes of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia* **23**, 1278-1287 (2009).
- 56 Kanga, U. *et al.* Role of killer immunoglobulin-like receptor-ligand interactions in human leukocyte antigen-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation proceedings* **44**, 919-921 (2012).
- 57 Moretta, A., Pende, D., Locatelli, F. & Moretta, L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clinical and experimental immunology* **157**, 325-331 (2009).
- 58 Yu, J. *et al.* Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **113**, 3875-3884 (2009).
- 59 Triplett, B., Handgretinger, R., Pui, C. H. & Leung, W. KIR-incompatible hematopoietic-cell transplantation for poor prognosis infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **107**, 1238-1239 (2006).

- 60 Savani, B. N. *et al.* Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **21**, 2145-2152 (2007).
- 61 Clausen, J. *et al.* Impact of natural killer cell dose and donor killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype on outcome following human leucocyte antigen-identical haematopoietic stem cell transplantation. *Clinical and experimental immunology* **148**, 520-528 (2007).
- 62 Madero Lopez, L., Benito Bernal, A. & Diaz Perez, M. A. [Hemopoietic stem cell transplantation in pediatrics]. *Anales espanoles de pediatria* **46**, 424-426 (1997).
- 63 Velardi, A. Natural killer cell alloreactivity 10 years later. *Current opinion in hematology* **19**, 421-426 (2012).
- 64 Velardi, A., Ruggeri, L. & Mancusi, A. Killer-cell immunoglobulin-like receptors reactivity and outcome of stem cell transplant. *Current opinion in hematology* **19**, 319-323 (2012).
- 65 Olson, J. A., Zeiser, R., Beilhack, A., Goldman, J. J. & Negrin, R. S. Tissue-specific homing and expansion of donor NK cells in allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* **183**, 3219-3228 (2009).
- 66 Kim, T. J. *et al.* FK506 causes cellular and functional defects in human natural killer cells. *Journal of leukocyte biology* **88**, 1089-1097 (2010).
- 67 Perez-Martinez, A. *et al.* KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors. *Pediatric blood & cancer* **53**, 120-124 (2009).
- 68 Perez-Martinez, A. *et al.* Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors. *Experimental hematology* **40**, 882-891 e881 (2012).
- 69 Bastos-Oreiro, M. *et al.* Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (iKIR) mismatches improve survival after T-cell-repleted haploidentical transplantation. *European journal of haematology* (2015).
- 70 Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097-2100 (2002).
- 71 Hu, B. *et al.* Donor NK Cells and IL-15 promoted engraftment in nonmyeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* **189**, 1661-1670 (2012).
- 72 Zecher, D. *et al.* NK cells delay allograft rejection in lymphopenic hosts by downregulating the homeostatic proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* **184**, 6649-6657 (2010).
- 73 Olson, J. A. *et al.* NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* **115**, 4293-4301 (2010).
- 74 Leung, W. *et al.* Inhibitory KIR-HLA receptor-ligand mismatch in autologous haematopoietic stem cell transplantation for solid tumour and lymphoma. *British journal of cancer* **97**, 539-542 (2007).
- 75 Stern, M., Paulussen, M., Rischewski, J., Tichelli, A. & Gratwohl, A. Missing ligand model in autologous stem cell transplantation. *British journal of cancer* **98**, 852-853; author reply 854 (2008).
- 76 Sullivan, E. M. *et al.* NK cell genotype and phenotype at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia correlate with postinduction residual disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 5986-5994 (2014).
- 77 Gonzalez, B. *et al.* [An immunological approach to acute myeloid leukaemia]. *An Pediatr (Barc)* **84**, 195-202 (2016).
- 78 Cooley, S. *et al.* KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood* **106**, 4370-4376 (2005).

- 79 Shilling, H. G. *et al.* Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* **101**, 3730-3740 (2003).
- 80 Yun, G. *et al.* A novel method for KIR-ligand typing by pyrosequencing to predict NK cell alloreactivity. *Clin Immunol* **123**, 272-280 (2007).
- 81 Gagne, K. *et al.* Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Human immunology* **63**, 271-280 (2002).
- 82 Cooley, S. *et al.* Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* **116**, 2411-2419 (2010).
- 83 Cooley, S. *et al.* Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* **113**, 726-732 (2009).
- 84 Stringaris, K. *et al.* Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **16**, 1257-1264 (2010).
- 85 Hsu, K. C. *et al.* KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **12**, 828-836 (2006).
- 86 Cook, M. A. *et al.* The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood* **103**, 1521-1526 (2004).
- 87 Bishara, A. *et al.* The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue antigens* **63**, 204-211 (2004).
- 88 Sun, J. Y. *et al.* Detrimental effect of natural killer cell alloreactivity in T-replete hematopoietic cell transplantation (HCT) for leukemia patients. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **13**, 197-205 (2007).
- 89 Lowe, E. J. *et al.* T-cell alloreactivity dominates natural killer cell alloreactivity in minimally T-cell-depleted HLA-non-identical paediatric bone marrow transplantation. *British journal of haematology* **123**, 323-326 (2003).
- 90 Perez-Martinez, A. *et al.* Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. *Bone marrow transplantation* **47**, 1419-1427 (2012).
- 91 Perez-Martinez, A. *et al.* Blood dendritic cells suppress NK cell function and increase the risk of leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **17**, 598-607 (2011).
- 92 Dulphy, N. *et al.* An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* **181**, 2227-2237 (2008).
- 93 Chen, G. *et al.* Expanded donor natural killer cell and IL-2, IL-15 treatment efficacy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *European journal of haematology* **81**, 226-235 (2008).
- 94 Parrado, A. *et al.* Repopulation of circulating T, B and NK lymphocytes following bone marrow and blood stem cell transplantation. *Hematology and cell therapy* **39**, 301-306 (1997).
- 95 Pende, D. *et al.* Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the

- involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* **105**, 2066-2073 (2005).
- 96 Pfeiffer, M. *et al.* Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia. *British journal of haematology* **138**, 97-100 (2007).
- 97 Carlsten, M. *et al.* Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD34+ blasts in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **24**, 1607-1616 (2010).
- 98 Nowbakht, P. *et al.* Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* **105**, 3615-3622 (2005).
- 99 Almalte, Z. *et al.* Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood* **118**, 1323-1328 (2011).
- 100 Zhang, Y. *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia: possible association with susceptibility to the disease. *Leukemia research* **34**, 55-58 (2010).
- 101 Babor, F. *et al.* Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood* **120**, 2770-2772; author reply 2772 (2012).
- 102 Imai, C., Iwamoto, S. & Campana, D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* **106**, 376-383 (2005).
- 103 Berg, M. *et al.* Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy* **11**, 341-355 (2009).
- 104 Szczepanski, M. J. *et al.* Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **59**, 73-79 (2010).
- 105 Stringaris, K. *et al.* Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **99**, 836-847 (2014).
- 106 Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* **356**, 1795-1799 (2000).
- 107 Viel, S. *et al.* Monitoring NK cell activity in patients with hematological malignancies. *Oncoimmunology* **2**, e26011 (2013).
- 108 Pages, F. *et al.* In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 5944-5951 (2009).
- 109 Siegler, U. *et al.* Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia* **19**, 2215-2222 (2005).
- 110 Rubnitz, J. E. *et al.* NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 955-959 (2010).
- 111 Cho, D. *et al.* Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 3901-3909 (2010).
- 112 Fernandez, L. *et al.* In vitro Natural Killer Cell Immunotherapy for Medulloblastoma. *Frontiers in oncology* **3**, 94 (2013).

- 113 Fernandez, L. *et al.* Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer letters* **368**, 54-63 (2015).
- 114 Hongeng, S. *et al.* Generation of CD3+ CD56+ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells. *International journal of hematology* **77**, 175-179 (2003).
- 115 Verneris, M. R., Kornacker, M., Mailander, V. & Negrin, R. S. Resistance of ex vivo expanded CD3+CD56+ T cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **49**, 335-345 (2000).
- 116 Muller, T. *et al.* Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **57**, 411-423 (2008).
- 117 Krieg, S. & Ullrich, E. Novel immune modulators used in hematology: impact on NK cells. *Frontiers in immunology* **3**, 388 (2012).
- 118 Nguyen, S. *et al.* Infusion of allogeneic natural killer cells in a patient with acute myeloid leukemia in relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion* **51**, 1769-1778 (2011).
- 119 Koehl, U. *et al.* IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood cells, molecules & diseases* **33**, 261-266 (2004).



**ANEXO**

## ANEXO

Tabla Anexa 1

| FÁRMACO      | EFFECTO INDIRECTO EN LAS CÉLULAS NK  | EFFECTO DIRECTO EN LAS CÉLULAS NK   |
|--------------|--|---|
| IMiDs        |  |   |
| Talidomida   | -Estimulación de la célula T (por aumento de IL-2 e IFN-g), con aumento de citotoxicidad y ADCC frente a K562 y células de MM  | -Incremento del nº de células Nk tras la terapia en pacientes con MM<br>-Citotoxicidad aumentada frente a células de MM   |
| Lenalidomida | -Estimulación de la célula T (por aumento de IL-2 e IFN-g), con aumento de citotoxicidad y ADCC frente a K562 y células de MM<br>-Incremento del nº y activación de las células NK por estimulación de as las CD sus citokinas en ratones SCID   | -Incremento del nº de células NKp44+ en paciente con recaída de MM<br>-Regulación al alza de CD56, CD16, CD40L y LFA1<br>-Regulación a la baja de SOCS1, NKAT2, NKB1, CD158ah y NKp46<br>-Aumento de la citotoxicidad frente a las células de MM<br>-Inhibición de la producción de IFN-g en células NK activadas |
| Pomalidomida | -Incremento del nº y activación de las células NK por estimulación de as las CD sus citokinas en ratones SCID<br>-Estimulación de la célula T (por aumento de IL-2 e IFN-g), con aumento de citotoxicidad y ADCC frente a K562 y células de MM<br>-Regulación al alza de CD69<br>-Incremento en la producción de IFN-g | -Regulación a la baja de SOCS1<br>-Incremento de la citotoxicidad frente a células de MM y K562   |

| FÁRMACO   | EFFECTO INDIRECTO EN LAS CÉLULAS NK  | EFFECTO DIRECTO EN LAS CÉLULAS NK   |
|-----------|--|---|
| TKIs      |  |   |
| Imatinib  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Regulación a la baja de NKG2DL en las células de LMC y K562</li> <li>-Regulación a la baja de ICMA-1 en células leucémicas BRC/ABL</li> <li>-Estimulación de CD, con aumento de la actividad NK</li> </ul>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Incremento del número de células NK post-terapia</li> <li>-Sin impacto en la citotoxicidad y producción de citoquinas “<i>in vitro</i>”</li> <li>-Incremento de la lisis dependiente de NKp30 y NKG2D y de la producción de IFN-g en pacientes con GIST.</li> </ul> |
| Nilotinib | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Regulación a la baja de los NKG2DL en células de LMC y K562</li> </ul> <p>Con disminución de la citotoxicidad y de la producción de IFN-g</p>  | -Inhibición de la producción de citoquinas sin efecto sobre citotoxicidad.  |
| Dasatinib | <ul style="list-style-type: none"> <li>Regulación a la baja de los NKG2DL en células de LMC y K562</li> </ul> <p>Con disminución de la citotoxicidad y de la producción de IFN-g</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Inhibición de la citotoxicidad (ratones)</li> <li>-Inhibición de la citotoxicidad frente a K562 y a la producción de citoquinas.</li> </ul>   |
| Sorafenib | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Incremento de MICA en las células de HC y disminución del MICA soluble, con incremento de la citotoxicidad.</li> <li>-Incremento de la expresión de NKG2DL en Ca nasofaríngeo, con aumento de la citotoxicidad.</li> </ul> | -Inhibición de la citotoxicidad y de la producción de citoquinas.   |
| Sunitinib | - Incremento de la expresión de NKG2DL, con aumento de la citotoxicidad.   | -Inhibición de la citotoxicidad y de la producción de citoquinas solo en altas dosis.   |

| FÁRMACO              | EFFECTO INDIRECTO EN LAS CÉLULAS NK   | EFFECTO DIRECTO EN LAS CÉLULAS NK  |
|----------------------|---|--|
| Agentes demetilantes |   |  |
| Azacitidina          | -Expresión de ligandos de NKG2D en células tumorales Raji y K562  | -Inducción de KIRs inhibitorios, con reducción de la citotoxicidad<br>-Regulación a la baja de CD16, NKG2D y NKp30<br>-Inhibición de la citotoxicidad hacia las células tumorales Raji y K562. |
| Decitabina           | -Expresión de ligandos de NKG2D en varias líneas celulares tumorales, con incremento de la citotoxicidad frente a ellas | -Inducción general de KIRs<br>-Incremento de la citotoxicidad frente a las células tumorales Raji y K562 y la producción de citosinas.   |

TABLA 1

| FÁRMACO                 | EFFECTO INDIRECTO EN LAS CÉLULAS NK  | EFFECTO DIRECTO EN LAS CÉLULAS NK   |
|-------------------------|--|---|
| HDACis                  |  |   |
| VPA                     | <p>-Expresión de ligandos de NKG2D en blastos de LMA, con incremento de la citotoxicidad.</p> <p>-Incremento de la expresión de ligandos de NKG2D en blastos de LLA B, incrementando la citotoxicidad.</p> | <p>-Disminución de NKG2D, NKp46 y NKp30.</p> <p>-Inhibición de la citotoxicidad frente a varias líneas tumorales.</p> <p>-Inhibición de la producción de citosinas.</p> |
| TSA                     | -Incremento de la expresión de ligandos de NKG2D en varios tipos de blast leucémicos, con incremento de la citotoxicidad.  | <p>-Disminución de NKG2D y NKp46 en NK resting y de NKp44 y CD25 en NK activadas</p> <p>-Inhibición de la producción de citocinas.</p>                                  |
| Vorinostat              | -Sensibilización de varias líneas tumorales para la citotoxicidad  | <p>-Disminución de NKp46 y NKp30</p> <p>-Disminución de la citotoxicidad frente a varias líneas tumorales</p> <p>-Inhibición de la producción de citocinas</p>          |
| Butirato de sodio       | -Sensibilización de varias líneas tumorales para la citotoxicidad  | <p>-Disminución de NKG2D y NKp46 en células NK resting</p> <p>-Inhibición de la producción de citosinas.</p>  |
| Romidepsin<br>Chidamida | -Incremento de ligandos de NKG2D en células tumorales.   | <p>-Incremento de la citotoxicidad hacia K562</p> <p>-Incremento de CD16, NKG2D, granzyma, perforina, KLRG1 y FASLG</p>   |

TABLA 1

Krieg and Ullrich <sup>118</sup>

| FÁRMACO                    | EFFECTO INDIRECTO EN LAS CÉLULAS NK   | EFFECTO DIRECTO EN LAS CÉLULAS NK  |
|----------------------------|---|--|
| Inhibidores de proteosomas |   |  |
| Bortezomib                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Incremento de ligandos de NKG2D en diversas líneas celulares, aumentando su susceptibilidad.</li> <li>-Incremento de la actividad de la Caspasa 8 con incremento de susceptibilidad frente a tumores.</li> <li>-Disminución de HLA-I en tumores hematológicos</li> <li>-Incremento de ligandos de NKG2D en blastos de LLA B, con incremento de su degranulación.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Efecto proapoptótico en células NK resting.</li> <li>-Disminución de NKp46, con disminución consecuente de la actividad.</li> </ul> <p>Inhibición de la citotoxicidad de las células Nk activadas frente a células mieloma múltiple.</p> |

TABLA 1

Krieg and Ullrich <sup>118</sup>

| GEN KIR              | SI (%)    | NO (%)    | NC (%)   |
|----------------------|-----------|-----------|----------|
| <b>2DL1</b>          | 33 (82,5) | 0 (0)     | 7 (17,5) |
| <b>2DL2</b>          | 18 (45)   | 15 (37,5) | 7 (17,5) |
| <b>2DL3</b>          | 31 (77,5) | 2 (5)     | 7 (17,5) |
| <b>2DL4</b>          | 33 (82,5) | 0 (0)     | 7 (17,5) |
| <b>2DL5ALL</b>       | 19 (47,5) | 13 (32,5) | 8 (20)   |
| <b>2DL5a</b>         | 9 (22,5)  | 15 (37,5) | 16 (40)  |
| <b>2DL5b</b>         | 11 (27,5) | 13 (32,5) | 16 (40)  |
| <b>2DS1</b>          | 15 (37,5) | 18 (45)   | 7 (17,5) |
| <b>2DS2</b>          | 18 (45)   | 15 (37,5) | 7 (17,5) |
| <b>2DS3</b>          | 12 (30)   | 21 (52,5) | 7 (17,5) |
| <b>2DS4del</b>       | 16 (40)   | 8 (20)    | 16 (40)  |
| <b>2DS4inv</b>       | 10 (25)   | 14 (35)   | 16 (40)  |
| <b>2DS5</b>          | 10 (25)   | 23 (57,5) | 7 (17,5) |
| <b>3DL1</b>          | 32 (80)   | 1 (2,5)   | 7 (17,5) |
| <b>3DL2</b>          | 33 (82,5) | 0 (0)     | 7 (17,5) |
| <b>3DL3</b>          | 33 (82,5) | 0 (0)     | 7 (17,5) |
| <b>3DS1</b>          | 16 (40)   | 17 (42,5) | 7 (17,5) |
| <b>HAPLOTIPO KIR</b> | A (%)     | B (%)     | NC (%)   |
|                      | 9 (22,5)  | 24 (60)   | 7 (17,5) |

NC= no consta

**Tabla Anexa 2**

| Receptor | HLA         | C1 | C2 | Bw4 | Bw6 |
|----------|-------------|----|----|-----|-----|
| 1        | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 2        | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 3        | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 4        | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 5        | Bw4Bw6      |    |    | si  | si  |
| 6        | C1C1 Bw4Bw6 | si | no | si  | si  |
| 7        | C1Bw6       | si |    |     | si  |
| 8        | C2C2 Bw6Bw6 | no | si | no  | si  |
| 9        | C1C2 Bw4Bw6 | si | si | si  | si  |
| 10       | C1Bw4Bw6    | si |    | si  | si  |
| 11       | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | si  |
| 12       | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | si  |
| 13       | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | si  |
| 14       | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | si  |
| 15       | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | si  |
| 16       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 17       | C1C2Bw4Bw4  | si | si | si  | no  |
| 18       | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | si  |
| 19       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 20       | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | si  |
| 21       | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | si  |
| 22       | C2C2Bw6Bw6  | no | si | no  | si  |
| 23       | C1C1Bw6     | si | no |     | si  |
| 24       | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | no  |
| 25       | C1C1Bw6Bw6  | si | no | no  | si  |
| 26       | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | si  |
| 27       | C2C2Bw6Bw6  | no | si | no  | si  |
| 28       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 29       | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | si  |
| 30       | C1Bw4Bw6    | si |    | si  | si  |
| 31       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 32       | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | si  |
| 33       | C2C2Bw4Bw6  | si | no | si  | si  |
| 34       | C1C1Bw4Bw4  | si | no | si  | so  |
| 35       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 36       | Bw4Bw6      |    |    | si  | si  |
| 37       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | si  |
| 38       | Bw4Bw6      |    |    | si  | si  |
| 39       | Bw4Bw4      |    |    | si  |     |
| 40       | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | si  |

Tabla Anexa 3



| <b>GEN KIR</b>       | <b>DONANTES</b> |           |          |
|----------------------|-----------------|-----------|----------|
| <b>2DL1</b>          | SI (%)          | NO (%)    | NC (%)   |
| <b>2DL2</b>          | 25 (69,4)       | 8 (22,2)  | 3 (8,3)  |
| <b>2DL3</b>          | 21 (58,3)       | 10 (27,8) | 5 (13,9) |
| <b>2DL4</b>          | 26 (72,2)       | 8 (22,2)  | 2 (5,6)  |
| <b>2DL5ALL</b>       | SI (%)          | NO (%)    | NC (%)   |
| <b>2DL5a</b>         | 39 (97,5)       | 1 (2,5)   | 0 (0)    |
| <b>2DL5b</b>         | 18 (45)         | 22 (55)   | 0 (0)    |
| <b>2DS1</b>          | 38 (95)         | 2 (5)     | 0 (0)    |
| <b>2DS2</b>          | 40 (100)        | 0 (0)     | 0 (0)    |
| <b>2DS3</b>          | 21 (52,5)       | 19 (47,5) | 0 (0)    |
| <b>2DS4del</b>       | 10 (25)         | 21 (52,5) | 9 (22,5) |
| <b>2DS4inv</b>       | 15 (37,5)       | 16 (40)   | 9 (22,5) |
| <b>2DS5</b>          | 15 (37,5)       | 25 (62,5) | 0 (0)    |
| <b>3DL1</b>          | 18 (45)         | 22 (55)   | 0 (0)    |
| <b>3DL2</b>          | 15 (37,5)       | 25 (62,5) | 0 (0)    |
| <b>3DL3</b>          | 23 (57,5)       | 7 (17,5)  | 10 (25)  |
| <b>3DS1</b>          | 11 (27,5)       | 19 (47,5) | 10 (25)  |
| <b>HAPLOTIPO KIR</b> | 10 (25)         | 30 (75)   | 0 (0)    |
|                      | A (%)           | B (%)     | NC (%)   |
|                      | 16 (40)         | 24 (60)   | 0 (0)    |

NC= no consta

Tabla Anexa 4

| Donante | HLA         | C1 | C2 | Bw4 | Bw6 |
|---------|-------------|----|----|-----|-----|
| 1       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 2       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 3       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 4       | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 5       | Bw4Bw6      |    |    | si  | Si  |
| 6       | C1C1 Bw4Bw6 | si | no | si  | Si  |
| 7       | C1Bw6       | si |    |     | Si  |
| 8       | C2C2 Bw6Bw6 | no | si | no  | Si  |
| 9       | C1C2 Bw4Bw6 | si | si | si  | Si  |
| 10      | C1Bw4Bw6    | si |    | si  | Si  |
| 11      | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | Si  |
| 12      | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | Si  |
| 13      | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | Si  |
| 14      | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | Si  |
| 15      | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | Si  |
| 16      | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 17      | C1C2Bw4Bw4  | si | si | si  | No  |
| 18      | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | Si  |
| 19      | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 20      | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | Si  |
| 21      | C2C2Bw4Bw6  | no | si | si  | Si  |
| 22      | C2C2Bw6Bw6  | no | si | no  | Si  |
| 23      | C1C1Bw6     | si | no |     | Si  |
| 24      | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | No  |
| 25      | C1C1Bw6Bw6  | si | no | no  | Si  |
| 26      | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | Si  |
| 27      | C2C2Bw6Bw6  | no | si | no  | Si  |
| 28      | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 29      | C1C1Bw4Bw6  | si | no | si  | Si  |
| 30      | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 31      | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 32      | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | Si  |
| 33      | C2C2Bw4Bw6  | si | no | si  | Si  |
| 34      | C1C1Bw4Bw4  | si | no | si  | No  |
| 35      | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 36      | C1C1Bw4Bw6  | si |    | si  | Si  |
| 37      | C1C2Bw4Bw6  | si | si | si  | Si  |
| 38      | Bw4Bw6      |    |    | si  | Si  |
| 39      | Bw4Bw4      |    |    | si  |     |
| 40      | C1C2Bw6Bw6  | si | si | no  | si  |

Tabla Anexa 5

|                               | <b>+30</b> | <b>+60</b> | <b>+90</b> | <b>+180</b> | <b>+360</b> | <b>+720</b> |
|-------------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>NK</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 222,34     | 264,84     | 184,15     | 148,73      | 161,30      | 208,21      |
| <b>LT</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 252,11     | 878,87     | 952,48     | 1142,43     | 1247,04     | 1785        |
| <b>CD4</b><br>(cels/10e9/mcL) | 84         | 192,68     | 283,46     | 363         | 516,26      | 875,30      |
| <b>CD8</b><br>(cels/10e9/mcL) | 148,17     | 649,65     | 590,06     | 699,56      | 655,08      | 834,56      |
| <b>LB</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 16         | 159,12     | 300,71     | 403         | 534,34      | 612,82      |

Tabla Anexa 6

|                               | <b>30</b> | <b>60</b> | <b>90</b> | <b>180</b> | <b>360</b> | <b>720</b> |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| <b>NK</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 283,62    | 170,07    | 154,36    | 119,08     | 158        | 212,64     |
| <b>LT</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 232,31    | 1255,36   | 1039,71   | 1206,42    | 1170,82    | 1774,18    |
| <b>CD4</b><br>(cels/10e9/mcL) | 85,38     | 239,36    | 315,5     | 381,08     | 520,25     | 794,09     |
| <b>CD8</b><br>(cels/10e9/mcL) | 136,38    | 954,79    | 592       | 767,5      | 581,42     | 798,64     |
| <b>LB</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 14,92     | 170,43    | 337,21    | 379,5      | 530,67     | 616,18     |

Tabla Anexa 7

|                               | <b>30</b> | <b>60</b> | <b>90</b> | <b>180</b> | <b>360</b> | <b>720</b> |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| <b>NK</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 186,14    | 338,56    | 207,33    | 168,5      | 164,91     | 204,17     |
| <b>LT</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 263,82    | 586,06    | 880,65    | 1099,78    | 1323,27    | 1795,82    |
| <b>CD4</b><br>(cels/10e9/mcL) | 83,18     | 156,39    | 258,56    | 350,94     | 511,91     | 949,75     |
| <b>CD8</b><br>(cels/10e9/mcL) | 155,14    | 412,33    | 588,56    | 654,28     | 735,45     | 867,5      |
| <b>LB</b><br>(cels/10e9/mcL)  | 16,64     | 150,33    | 272,33    | 419,59     | 538,36     | 609,75     |

Tabla Anexa 8

| LIGANDO     | N  | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|-------------|----|-------|-------|--------|--------|
| HLA-I       | 19 | 49,75 | 74,14 | 2,86   | 314,00 |
| MICA/B      | 19 | 10,25 | 10,62 | 1,46   | 36,58  |
| CXCL6       | 17 | 15,57 | 25,23 | 0,95   | 105,00 |
| MICA        | 19 | 11,25 | 14,43 | -2,00  | 60,50  |
| ULBP1       | 19 | 12,27 | 14,18 | 1,86   | 60,50  |
| ULBP2       | 19 | 12,82 | 17,44 | 0,81   | 64,00  |
| ULBP3       | 19 | 7,68  | 8,42  | 0,79   | 33,91  |
| ULBP4       | 18 | 9,55  | 10,39 | 2,02   | 44,00  |
| FAS         | 19 | 87,42 | 85,07 | 4,79   | 320,00 |
| CD 155      | 19 | 7,81  | 6,07  | 0,45   | 20,38  |
| CD 112      | 19 | 51,56 | 58,33 | 4,41   | 250,75 |
| CD 69       | 17 | 10,64 | 12,33 | 1,20   | 41,25  |
| MICAB/HLA-I | 19 | 0,92  | 1,59  | 0,06   | 5,57   |
| MICA/HLA-I  | 19 | 0,80  | 1,48  | 0,00   | 6,78   |
| ULPB1/HLA-I | 19 | 0,69  | 0,95  | 0,09   | 4,45   |
| ULBP2/HLA-I | 19 | 0,66  | 0,80  | 0,01   | 3,67   |
| ULBP3/HLA-I | 19 | 0,40  | 0,35  | 0,01   | 1,32   |
| ULBP4/HLA-I | 18 | 0,72  | 1,35  | 0,02   | 5,97   |

Tabla Anexa 9

| LIGANDO     |     | N  | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|-------------|-----|----|-------|-------|--------|--------|
| HLA-I       | LLA | 15 | 59,33 | 81,21 | 2,86   | 314,00 |
|             | LMA | 4  | 13,84 | 4,89  | 6,82   | 17,30  |
| MICA/B      | LLA | 15 | 11,62 | 11,54 | 2,03   | 36,58  |
|             | LMA | 4  | 5,11  | 3,25  | 1,46   | 9,33   |
| CXCL6       | LLA | 13 | 17,06 | 28,62 | 0,95   | 105,00 |
|             | LMA | 4  | 10,73 | 8,89  | 2,93   | 23,15  |
| MICA        | LLA | 15 | 12,59 | 15,94 | -1,00  | 60,50  |
|             | LMA | 4  | 6,49  | 4,01  | 2,92   | 12,21  |
| ULBP1       | LLA | 15 | 13,70 | 15,62 | 1,86   | 60,50  |
|             | LMA | 4  | 6,90  | 4,29  | 2,36   | 12,32  |
| ULBP2       | LLA | 15 | 14,24 | 19,41 | 0,81   | 64,00  |
|             | LMA | 4  | 7,46  | 4,30  | 3,90   | 13,69  |
| ULBP3       | LLA | 15 | 8,85  | 9,04  | 0,79   | 33,91  |
|             | LMA | 4  | 3,30  | 3,45  | 0,86   | 8,38   |
| ULBP4       | LLA | 14 | 10,76 | 11,44 | 2,02   | 44,00  |
|             | LMA | 4  | 5,33  | 3,76  | 2,18   | 10,76  |
| FAS         | LLA | 15 | 90,30 | 93,70 | 4,79   | 320,00 |
|             | LMA | 4  | 76,61 | 47,47 | 21,66  | 128,62 |
| CD 155      | LLA | 15 | 8,26  | 6,38  | 1,69   | 20,38  |
|             | LMA | 4  | 6,12  | 5,10  | 0,45   | 12,80  |
| CD 112      | LLA | 15 | 57,54 | 63,48 | 6,29   | 250,75 |
|             | LMA | 4  | 29,13 | 27,57 | 4,41   | 67,40  |
| CD 69       | LLA | 13 | 12,88 | 13,30 | 1,6    | 41,3   |
|             | LMA | 4  | 3,35  | 3,24  | 1,2    | 8,1    |
| MICAB/HLA-I | LLA | 15 | 0,73  | 1,36  | 0,06   | 5,57   |
|             | LMA | 4  | 1,62  | 2,37  | 0,31   | 5,18   |
| MICA/HLA-I  | LLA | 15 | 0,44  | 0,33  | -0,01  | 1,18   |
|             | LMA | 4  | 2,15  | 3,09  | 0,34   | 6,78   |
| ULPB1/HLA-I | LLA | 15 | 0,44  | 0,30  | 0,09   | 1,09   |
|             | LMA | 4  | 1,62  | 1,89  | 0,61   | 4,45   |
| ULBP2/HLA-I | LLA | 15 | 0,42  | 0,32  | 0,01   | 0,93   |
|             | LMA | 4  | 1,58  | 1,40  | 0,80   | 3,67   |
| ULBP3/HLA-I | LLA | 15 | 0,34  | 0,28  | 0,0    | 0,9    |
|             | LMA | 4  | 0,64  | 0,53  | 0,2    | 1,3    |
| ULBP4/HLA-I | LLA | 14 | 0,40  | 0,35  | 0,02   | 1,23   |
|             | LMA | 4  | 1,86  | 2,75  | 0,22   | 5,97   |

Tabla Anexa 10

| LIGANDO           | N  | MEDIA  | SD     | MINIMO | MAXIMO |
|-------------------|----|--------|--------|--------|--------|
| HLA-I NUEVA       | 10 | 34,94  | 30,98  | 2,86   | 78,69  |
| REC/REF           | 9  | 66,21  | 103,49 | 8,89   | 314    |
| MICA/B NUEVA      | 10 | 10,65  | 11,05  | 2,27   | 31,38  |
| REC/REF           | 9  | 9,80   | 10,77  | 1,46   | 36,58  |
| CXCL6 NUEVA       | 10 | 16,12  | 31,40  | 0,95   | 105,00 |
| REC/REF           | 7  | 14,79  | 14,75  | 2,93   | 41,07  |
| MICA NUEVA        | 10 | 10,11  | 10,62  | -2,00  | 36,90  |
| REC/REF           | 9  | 12,52  | 18,38  | 2,00   | 60,50  |
| ULBP1 NUEVA       | 10 | 7,97   | 10,05  | 1,91   | 37,60  |
| REC/REF           | 9  | 14,22  | 18,17  | 1,86   | 60,50  |
| ULBP2 NUEVA       | 10 | 16,12  | 22,86  | 0,81   | 64,00  |
| REC/REF           | 9  | 9,14   | 8,23   | 1,90   | 27,07  |
| ULBP3 NUEVA       | 10 | 5,84   | 6,29   | 1,56   | 22,90  |
| REC/REF           | 9  | 9,72   | 10,30  | 0,79   | 33,91  |
| ULBP4 NUEVA       | 9  | 14,43  | 12,78  | 4,02   | 44,00  |
| REC/REF           | 9  | 4,68   | 3,56   | 2,02   | 13,37  |
| FAS NUEVA         | 10 | 107,53 | 102,25 | 4,79   | 20,38  |
| REC/REF           | 9  | 65,07  | 58,76  | 21,27  | 193,61 |
| CD 155 NUEVA      | 10 | 10,03  | 5,99   | 1,69   | 20,38  |
| REC/REF           | 9  | 5,34   | 5,44   | 0,45   | 19,23  |
| CD 112 NUEVA      | 10 | 70,45  | 72,36  | 6,29   | 250,75 |
| REC/REF           | 9  | 30,58  | 28,70  | 4,41   | 93,58  |
| CD 69 NUEVA       | 9  | 10,28  | 12,63  | 1,52   | 41,25  |
| REC/REF           | 8  | 11,05  | 12,84  | 1,20   | 37,33  |
| MICAB/HLA-I NUEVA | 10 | 0,90   | 1,52   | 0,06   | 5,18   |
| REC/REF           | 9  | 0,94   | 1,76   | 0,10   | 5,57   |
| MICA/HLA-I NUEVA  | 10 | 1,13   | 2,02   | 0,00   | 6,78   |
| REC/REF           | 9  | 0,44   | 0,26   | 0,10   | 0,76   |
| ULPB1/HLA-I NUEVA | 10 | 0,85   | 1,29   | 0,09   | 4,45   |
| REC/REF           | 9  | 0,52   | 0,32   | 0,13   | 1,09   |
| ULBP2/HLA-I NUEVA | 10 | 0,85   | 1,04   | 0,01   | 3,67   |
| REC/REF           | 9  | 0,45   | 0,36   | 0,04   | 1,01   |
| ULBP3/HLA-I NUEVA | 10 | 0,48   | 0,42   | 0,01   | 1,32   |
| REC/REF           | 9  | 0,32   | 0,26   | 0,04   | 0,80   |
| ULBP4/HLA-I NUEVA | 9  | 1,10   | 1,84   | 0,07   | 5,97   |
| REC/REF           | 9  | 0,34   | 0,37   | 0,02   | 1,23   |

Tabla Anexa 11

| LIGANDO          | N  | MEDIA | SD     | MINIMO  | MAXIMO |
|------------------|----|-------|--------|---------|--------|
| HLA-I VIVO       | 12 | 33,53 | 29,19  | 2,86    | 78,69  |
| EXITUS           | 7  | 77,57 | 116,19 | 9,04    | 314,00 |
| MICA/B VIVO      | 12 | 10,23 | 10,04  | 2,27    | 31,37  |
| EXITUS           | 7  | 10,27 | 12,39  | 1,46    | 36,58  |
| CXCL6 VIVO       | 11 | 15,25 | 29,93  | 0,95    | 105,00 |
| EXITUS           | 6  | 16,16 | 15,66  | 2,93    | 41,07  |
| MICA VIVO        | 12 | 9,45  | 9,66   | -1,00   | 36,90  |
| EXITUS           | 7  | 14,48 | 20,65  | 2,00    | 60,50  |
| ULBP1 VIVO       | 12 | 9,72  | 9,28   | 1,91    | 37,60  |
| EXITUS           | 7  | 16,64 | 20,24  | 1,86    | 60,50  |
| ULBP2 VIVO       | 12 | 14,28 | 21,16  | 0,81    | 64,00  |
| EXITUS           | 7  | 10,30 | 8,94   | 1,95    | 27,07  |
| ULBP3 VIVO       | 12 | 6,43  | 6,50   | 1,56    | 22,90  |
| EXITUS           | 7  | 9,81  | 11,26  | 0,79    | 33,91  |
| ULBP4 VIVO       | 11 | 12,35 | 12,34  | 2,71    | 44,00  |
| EXITUS           | 7  | 5,17  | 3,95   | 2,02    | 13,37  |
| FAS VIVO         | 12 | 96,61 | 95,96  | 4,79    | 320,00 |
| EXITUS           | 7  | 71,66 | 66,09  | 21,27   | 193,61 |
| CD 155 VIVO      | 12 | 10,27 | 6,37   | 1,69    | 20,38  |
| EXITUS           | 7  | 3,60  | 1,80   | 0,45    | 6,25   |
| CD 112 VIVO      | 12 | 64,62 | 67,70  | 6,29    | 250,75 |
| EXITUS           | 7  | 29,18 | 29,67  | 4,41    | 93,58  |
| CD 69 VIVO       | 10 | 9,64  | 12,07  | 1,52    | 41,25  |
| EXITUS           | 7  | 12,06 | 13,52  | 1,20    | 37,33  |
| MICAB/HLA-I VIVO | 12 | 0,84  | 1,39   | 0,06    | 5,18   |
| EXITUS           | 7  | 1,05  | 1,99   | 0,10    | 5,57   |
| MICA/HLA-I VIVO  | 12 | 1,00  | 1,8514 | -0,0140 | 6,78   |
| EXITUS           | 7  | 0,46  | 0,2623 | 0,0952  | 0,76   |
| ULBP1/HLA-I VIVO | 12 | 0,77  | 1,1852 | 0,0912  | 4,45   |
| EXITUS           | 7  | 0,56  | 0,3321 | 0,1265  | 1,09   |
| ULBP2/HLA-I VIVO | 12 | 0,76  | 0,9716 | 0,0143  | 3,67   |
| EXITUS           | 7  | 0,49  | 0,3728 | 0,0852  | 1,01   |
| ULBP3/HLA-I VIVO | 12 | 0,45  | 0,4008 | 0,0143  | 1,32   |
| EXITUS           | 7  | 0,32  | 0,2526 | 0,0852  | 0,80   |
| ULBP4/HLA-I VIVO | 11 | 0,94  | 1,69   | 0,0616  | 5,97   |
| EXITUS           | 7  | 0,38  | 0,4133 | 0,0200  | 1,23   |

Tabla Anexa 12

| GEN      | SI | NO | NC |
|----------|----|----|----|
| 2DL1     | 20 | 0  | 2  |
| 2DL2     | 17 | 3  | 2  |
| 2DL3     | 19 | 1  | 2  |
| 2DL4     | 20 | 0  | 2  |
| 2DL5ALL  | 11 | 9  | 2  |
| 2DL5a    | 8  | 12 | 2  |
| 2DL5b    | 9  | 11 | 2  |
| 2DS1     | 8  | 12 | 2  |
| 2DS2     | 13 | 7  | 2  |
| 2DS3     | 5  | 15 | 2  |
| 2DS4 del | 18 | 2  | 2  |
| 2DS4 inv | 12 | 8  | 2  |
| 2DS5     | 5  | 15 | 2  |
| 3DL1     | 20 | 0  | 2  |
| 3DL2     | 20 | 0  | 2  |
| 3DL3     | 20 | 0  | 2  |
| 3DS1     | 8  | 12 | 2  |
| 2DP1     | 20 | 0  | 2  |
| 3DP1     | 20 | 0  | 2  |

Tabla Anexa 13



| GEN      |     | SI | NO | NC |
|----------|-----|----|----|----|
| 2DL1     | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |
| 2DL2     | LLA | 12 | 2  | 2  |
| LMA      |     | 5  | 1  | 0  |
| 2DL3     | LLA | 13 | 1  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |
| 2DL4     | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |
| 2DL5ALL  | LLA | 7  | 7  | 2  |
| LMA      |     | 4  | 2  | 0  |
| 2DL5a    | LLA | 5  | 9  | 2  |
| LMA      |     | 3  | 3  | 0  |
| 2DL5b    | LLA | 6  | 8  | 2  |
| LMA      |     | 3  | 3  | 0  |
| 2DS1     | LLA | 5  | 9  | 2  |
| LMA      |     | 3  | 3  | 0  |
| 2DS2     | LLA | 8  | 6  | 2  |
| LMA      |     | 5  | 1  | 0  |
| 2DS3     | LLA | 3  | 11 | 2  |
| LMA      |     | 2  | 4  | 0  |
| 2DS4 del | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 4  | 2  | 0  |
| 2DS4 inv | LLA | 7  | 7  | 2  |
| LMA      |     | 5  | 1  | 0  |
| 2DS5     | LLA | 3  | 11 | 2  |
| LMA      |     | 2  | 4  | 0  |
| 3DL1     | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |
| 3DL2     | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |
| 3DL3     | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |
| 3DS1     | LLA | 5  | 9  | 2  |
| LMA      |     | 3  | 3  | 0  |
| 2DP1     | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |
| 3DP1     | LLA | 14 | 0  | 2  |
| LMA      |     | 6  | 0  | 0  |

Tabla Anexa 14

| GEN      |         | SI | NO | NC |
|----------|---------|----|----|----|
| 2DL1     | DE NOVO | 10 | 0  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |
| 2DL2     | DE NOVO | 8  | 2  | 1  |
|          | REC/REF | 9  | 1  | 1  |
| 2DL3     | DE NOVO | 9  | 1  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |
| 2DL4     | DE NOVO | 10 | 0  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |
| 2DL5ALL  | DE NOVO | 6  | 4  | 1  |
|          | REC/REF | 5  | 5  | 1  |
| 2DL5a    | DE NOVO | 4  | 6  | 1  |
|          | REC/REF | 4  | 6  | 1  |
| 2DL5b    | DE NOVO | 6  | 4  | 1  |
|          | REC/REF | 3  | 7  | 1  |
| 2DS1     | DE NOVO | 4  | 6  | 1  |
|          | REC/REF | 4  | 6  | 1  |
| 2DS2     | DE NOVO | 7  | 3  | 1  |
|          | REC/REF | 6  | 4  | 1  |
| 2DS3     | DE NOVO | 3  | 7  | 1  |
|          | REC/REF | 2  | 8  | 1  |
| 2DS4 del | DE NOVO | 9  | 1  | 1  |
|          | REC/REF | 9  | 1  | 1  |
| 2DS4 inv | DE NOVO | 4  | 6  | 1  |
|          | REC/REF | 8  | 2  | 1  |
| 2DS5     | DE NOVO | 3  | 7  | 1  |
|          | REC/REF | 2  | 8  | 1  |
| 3DL1     | DE NOVO | 10 | 0  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |
| 3DL2     | DE NOVO | 10 | 0  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |
| 3DL3     | DE NOVO | 10 | 0  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |
| 3DS1     | DE NOVO | 4  | 6  | 1  |
|          | REC/REF | 4  | 6  | 1  |
| 2DP1     | DE NOVO | 10 | 0  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |
| 3DP1     | DE NOVO | 10 | 0  | 1  |
|          | REC/REF | 10 | 0  | 1  |

Tabla Anexa 15

| GEN      |        | SI | NO | NC |
|----------|--------|----|----|----|
| 2DL1     | VIVO   | 11 | 0  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |
| 2DL2     | VIVO   | 9  | 2  | 2  |
|          | EXITUS | 8  | 1  | 0  |
| 2DL3     | VIVO   | 10 | 1  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |
| 2DL4     | VIVO   | 11 | 0  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |
| 2DL5ALL  | VIVO   | 6  | 5  | 2  |
|          | EXITUS | 5  | 4  | 0  |
| 2DL5a    | VIVO   | 4  | 7  | 2  |
|          | EXITUS | 4  | 5  | 0  |
| 2DL5b    | VIVO   | 6  | 5  | 2  |
|          | EXITUS | 3  | 6  | 0  |
| 2DS1     | VIVO   | 4  | 7  | 2  |
|          | EXITUS | 4  | 5  | 0  |
| 2DS2     | VIVO   | 8  | 3  | 2  |
|          | EXITUS | 5  | 4  | 0  |
| 2DS3     | VIVO   | 3  | 8  | 2  |
|          | EXITUS | 2  | 7  | 0  |
| 2DS4 del | VIVO   | 10 | 1  | 2  |
|          | EXITUS | 8  | 1  | 0  |
| 2DS4 inv | VIVO   | 4  | 7  | 2  |
|          | EXITUS | 8  | 1  | 0  |
| 2DS5     | VIVO   | 8  | 3  | 2  |
|          | EXITUS | 2  | 7  | 0  |
| 3DL1     | VIVO   | 11 | 0  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |
| 3DL2     | VIVO   | 1  | 0  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |
| 3DL3     | VIVO   | 11 | 0  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |
| 3DS1     | VIVO   | 4  | 7  | 2  |
|          | EXITUS | 4  | 5  | 0  |
| 2DP1     | VIVO   | 11 | 0  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |
| 3DP1     | VIVO   | 11 | 0  | 2  |
|          | EXITUS | 9  | 0  | 0  |

Tabla Anexa 16

| Paciente | NK total 0<br>(millones de células) | NK total FIN<br>(millones de células) |
|----------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 1        |                                     |                                       |
| 2        |                                     |                                       |
| 3        | 0,022                               | 0,612                                 |
| 4        | 0,035                               | 1,072                                 |
| 5        | 0,039                               | 0,931                                 |
| 6        | 0,237                               | 11,41                                 |
| 7        | 0,319                               | 15,36                                 |
| 8        | 0,029                               | 10,015                                |
| 9        | 0,048                               | 0,295                                 |
| 10       | 0,07                                | 19,115                                |
| 11       | 0,07                                | 4,489                                 |
| 12       | 0,064                               | 5,697                                 |
| 13       | 0,089                               | 1,109                                 |
| 14       | 0,062                               |                                       |
| 15       | 0,618                               | 9,841                                 |
| 16       | 1,852                               | 74,75                                 |
| 17       | 0,034                               | 3,15                                  |
| 18       | 0,013                               | 1,2                                   |
| 19       | 0,043                               | 1,165                                 |

Tabla Anexa 17

| CÉLULA    | N  | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|-----------|----|-------|-------|--------|--------|
| NK        | 18 | 51,84 | 30,72 | 5,20   | 92,45  |
| NKT       | 17 | 10,08 | 5,44  | 0,47   | 20,70  |
| LT        | 17 | 27,23 | 24,78 | 0,59   | 72,40  |
| LB        | 16 | 1,31  | 3,79  | 0,00   | 15,20  |
| NK DIM    | 17 | 68,03 | 21,55 | 12,30  | 92,20  |
| NK BRIGHT | 17 | 29,15 | 22,04 | 4,81   | 85,00  |

Tabla Anexa 18

| CÉLULA    |     | N  | MEDIA   | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|-----------|-----|----|---------|-------|--------|--------|
| NK        | LLA | 15 | 47,75   | 32,03 | 5      | 92     |
|           | LMA | 3  | 72,34   | 9,05  | 62     | 80     |
| NKT       | LLA | 14 | 10,64   | 5,71  | 0,47   | 20,70  |
|           | LMA | 3  | 7,46    | 3,46  | 4,38   | 11,21  |
| LT        | LLA | 14 | 30,5493 | 26,24 | 0,59   | 72,40  |
|           | LMA | 3  | 11,7200 | 0,89  | 10,73  | 12,44  |
| LB        | LLA | 13 | 1,61    | 4,18  | 0      | 15     |
|           | LMA | 3  | 0       | 0     | 0      | 0      |
| NK DIM    | LLA | 14 | 69,88   | 16,90 | 32,50  | 92,20  |
|           | LMA | 3  | 59,39   | 41,51 | 12,30  | 90,70  |
| NK BRIGHT | LLA | 14 | 26,98   | 17,53 | 6,62   | 63,43  |
|           | LMA | 3  | 39,29   | 41,26 | 4,81   | 85,00  |

Tabla Anexa 19

| CÉLULA    |         | N  | MEDIA | SD    | MEDIANA | MINIMO | MAXIMO |
|-----------|---------|----|-------|-------|---------|--------|--------|
| NK        | NUEVA   | 11 | 49,41 | 31,96 | 69,50   | 5,20   | 81,98  |
|           | REC/REF | 7  | 55,67 | 30,71 | 62,35   | 5,60   | 92,45  |
| NKT       | NUEVA   | 10 | 10,34 | 5,20  | 9,5150  | 4,38   | 20,70  |
|           | REC/REF | 7  | 9,71  | 6,16  | 10,60   | 0,47   | 17,90  |
| LT        | NUEVA   | 10 | 27,40 | 26,70 | 12,23   | 7,16   | 72,40  |
|           | REC/REF | 7  | 26,97 | 23,84 | 28,50   | 0,59   | 65,70  |
| LB        | NUEVA   | 10 | 1,84  | 4,75  | 0       | 0,00   | 15,20  |
|           | REC/REF | 6  | 0,42  | 1,02  | 0       | 0,00   | 2,50   |
| NK DIM    | NUEVA   | 10 | 68,01 | 26,60 | 78,25   | 12,30  | 92,20  |
|           | REC/REF | 7  | 68,06 | 13,30 | 70,50   | 49,90  | 85,60  |
| NK BRIGHT | NUEVA   | 10 | 27,75 | 26,99 | 16,98   | 4,81   | 85,00  |
|           | REC/REF | 7  | 31,16 | 13,96 | 28,06   | 11,67  | 56,10  |

Tabla Anexa 20

| CÉLULA    |        | N  | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|-----------|--------|----|-------|-------|--------|--------|
| NK        | VIVO   | 13 | 49,39 | 29,69 | 5      | 82     |
|           | EXITUS | 5  | 58,22 | 35,98 | 6      | 92     |
| NKT       | VIVO   | 12 | 10,96 | 5,19  | 4,38   | 20,70  |
|           | EXITUS | 5  | 7,97  | 6,02  | 0,47   | 11,21  |
| LT        | VIVO   | 12 | 28,74 | 24,52 | 7,16   | 72,40  |
|           | EXITUS | 5  | 23,60 | 27,92 | 0,59   | 65,70  |
| LB        | VIVO   | 12 | 1,90  | 4,51  | 0      | 3      |
|           | EXITUS | 5  | 0     | 0     | 0      | 0      |
| NK DIM    | VIVO   | 12 | 66,67 | 24,64 | 12,3   | 92,2   |
|           | EXITUS | 5  | 71,30 | 12,99 | 50,3   | 85,6   |
| NK BRIGHT | VIVO   | 12 | 30,33 | 25,74 | 4,81   | 85     |
|           | EXITUS | 5  | 26,33 | 10,36 | 11,67  | 40,70  |

Tabla Anexa 21

| CÉLULA    |      | N | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|-----------|------|---|-------|-------|--------|--------|
| NK        | LA   | 8 | 2,27  | 2,23  | 0,40   | 6,40   |
|           | SANO | 5 | 15,24 | 12,20 | 3,70   | 35,77  |
| NKT       | LA   | 8 | 0,60  | 0,63  | 0      | 1,8    |
|           | SANO | 5 | 3,65  | 2,10  | 1,82   | 6,96   |
| LT        | LA   | 8 | 47,40 | 35,50 | 1,60   | 87,20  |
|           | SANO | 5 | 67,91 | 13,98 | 44,01  | 80,16  |
| LB        | LA   | 8 | 31,16 | 28,65 | 0,40   | 84,30  |
|           | SANO | 5 | 11,25 | 2,90  | 7,82   | 14,00  |
| NK DIM    | LA   | 8 | 75,91 | 9,70  | 60,00  | 88,90  |
|           | SANO | 5 | 87,09 | 5,85  | 77,96  | 92,47  |
| NK BRIGHT | LA   | 8 | 14,65 | 6,18  | 5,10   | 26,20  |
|           | SANO | 5 | 12,55 | 5,47  | 7,73   | 21,29  |

Tabla Anexa 22

| CÉLULA       | N  | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|--------------|----|-------|-------|--------|--------|
| NK LA        | 18 | 51,84 | 30,72 | 5,20   | 92,45  |
|              | 6  | 82,59 | 14,98 | 58,94  | 97,07  |
| NKT LA       | 17 | 10,08 | 5,44  | 0,47   | 20,70  |
|              | 6  | 6,07  | 7,41  | 0,94   | 20,25  |
| LT LA        | 17 | 27,23 | 24,78 | 0,59   | 72,40  |
|              | 6  | 10,27 | 8,44  | 1,30   | 22,22  |
| LB LA        | 16 | 1,31  | 3,79  | 0      | 15,00  |
|              | 6  | 0     | 0     | 0      | 0,01   |
| NK DIM LA    | 17 | 68,03 | 21,55 | 12,30  | 92,20  |
|              | 6  | 93,23 | 3,10  | 89,45  | 97,28  |
| NK BRIGHT LA | 17 | 29,15 | 22,04 | 4,81   | 85,00  |
|              | 6  | 8,38  | 6,24  | 2,49   | 19,20  |

Tabla Anexa 23

| RECEPTOR | N  | MEDIA | SD    | MEDIANA | MINIMO | MAXIMO |
|----------|----|-------|-------|---------|--------|--------|
| KIR2L1   | 17 | 5,46  | 11,37 | 1,27    | 0,27   | 46,49  |
| KIR2DL2  | 17 | 8,19  | 9,96  | 2,66    | 0,00   | 35,68  |
| KIR3DL1  | 17 | 2,51  | 3,16  | 1,30    | 0,00   | 12,40  |
| CD25     | 17 | 69,17 | 27,22 | 76,85   | 12,80  | 97,30  |
| CD69     | 17 | 78,81 | 20,95 | 79,84   | 14,50  | 99,50  |
| KIR2DS4  | 17 | 79,04 | 17,90 | 83,80   | 27,90  | 98,90  |
| NKG2D    | 17 | 91,02 | 9,52  | 93,90   | 70,04  | 99,90  |
| NKp44    | 17 | 78,84 | 12,29 | 79,13   | 57,02  | 98,40  |
| NKp46    | 11 | 88,29 | 9,31  | 89,76   | 69,03  | 98,70  |
| NKp30    | 17 | 90,18 | 8,74  | 91,26   | 66,55  | 99,40  |
| DNAM-1   | 17 | 86,39 | 8,38  | 87,96   | 63,40  | 96,67  |
| NKG2A    | 17 | 86,15 | 8,53  | 88,50   | 63,00  | 98,10  |
| CXCR6    | 13 | 36,49 | 13,70 | 35,15   | 16,10  | 58,45  |

Tabla Anexa 24

| LIGANDO |     | N  | MEDIA | SD    | MEDIANA | MINIMO | MAXIMO |
|---------|-----|----|-------|-------|---------|--------|--------|
| KIR2DL1 | LLA | 14 | 6,15  | 12,47 | 1,41    | 0,27   | 46,49  |
|         | LMA | 3  | 2,27  | 2,14  | 1,21    | 0,86   | 4,73   |
| KIR2DL2 | LLA | 14 | 8,58  | 10,52 | 3,08    | 0,00   | 35,68  |
|         | LMA | 3  | 6,38  | 8,27  | 2,29    | 0,94   | 15,90  |
| KIR3DL1 | LLA | 14 | 2,94  | 3,34  | 1,58    | 0,00   | 12,40  |
|         | LMA | 3  | 0,49  | 0,39  | 0,34    | 0,20   | 0,93   |
| CD25    | LLA | 14 | 64,22 | 27,51 | 73,88   | 12,80  | 97,30  |
|         | LMA | 3  | 92,24 | 6,03  | 95,34   | 85,29  | 96,10  |
| CD69    | LLA | 14 | 77,56 | 22,79 | 81,29   | 14,5   | 99,5   |
|         | LMA | 3  | 84,64 | 8,55  | 79,84   | 79,6   | 94,5   |
| KIR2DS4 | LLA | 14 | 77,94 | 19,06 | 83,35   | 27,90  | 98,90  |
|         | LMA | 3  | 84,14 | 12,37 | 90,12   | 69,92  | 92,38  |
| NKG2D   | LLA | 14 | 89,96 | 10,08 | 93,43   | 70,04  | 99,90  |
|         | LMA | 3  | 95,95 | 4,55  | 97,10   | 90,94  | 99,81  |
| NKp44   | LLA | 14 | 78,25 | 12,96 | 79,86   | 57,02  | 98,40  |
|         | LMA | 3  | 81,58 | 10,06 | 78,18   | 73,65  | 92,90  |
| NKp46   | LLA | 8  | 86,57 | 9,41  | 87,51   | 69,03  | 98,66  |
|         | LMA | 3  | 92,89 | 8,91  | 97,34   | 82,63  | 98,70  |
| NKp30   | LLA | 14 | 89,71 | 9,44  | 89,86   | 66,55  | 99,40  |
|         | LMA | 3  | 92,35 | 4,79  | 94,69   | 86,84  | 95,52  |
| DNAM-1  | LLA | 14 | 84,92 | 8,36  | 86,10   | 63,40  | 95,52  |
|         | LMA | 3  | 93,26 | 4,55  | 95,02   | 88,09  | 96,67  |
| NKG2A   | LLA | 14 | 85,77 | 9,22  | 87,63   | 63,00  | 98,10  |
|         | LMA | 3  | 87,91 | 4,93  | 89,62   | 82,36  | 91,76  |
| CXCR6   | LLA | 10 | 33,79 | 14,53 | 31,65   | 16,10  | 58,45  |
|         | LMA | 3  | 45,49 | 4,29  | 45,74   | 41,08  | 49,64  |

Tabla Anexa 25



| LIGANDO |         | N  | MEDIA | SD    | MEDIANA | MINIMO | MAXIMO |
|---------|---------|----|-------|-------|---------|--------|--------|
| KIR2DI1 | DE NOVO | 10 | 6,47  | 14,17 | 1,43    | 0,30   | 46,49  |
|         | REC/REF | 7  | 4,02  | 6,26  | 0,86    | 0,27   | 16,85  |
| KIR2DL2 | DE NOVO | 10 | 8,64  | 11,02 | 3,08    | 0,00   | 35,68  |
|         | REC/REF | 7  | 7,55  | 0,04  | 2,50    | 1,89   | 26,88  |
| KIR3DL1 | DE NOVO | 10 | 2,18  | 2,34  | 1,58    | 0,00   | 7,74   |
|         | REC/REF | 7  | 2,99  | 4,24  | 1,24    | 0,61   | 12,40  |
| CD25    | DE NOVO | 10 | 77,15 | 18,93 | 81,29   | 30,60  | 97,30  |
|         | REC/REF | 7  | 57,77 | 34,35 | 70,03   | 12,80  | 96,97  |
| CD69    | DE NOVO | 10 | 70,64 | 22,60 | 78,60   | 14,50  | 93,10  |
|         | REC/REF | 7  | 90,48 | 11,56 | 94,51   | 72,00  | 99,50  |
| KIR2DS4 | DE NOVO | 10 | 80,25 | 12,45 | 83,35   | 57,80  | 97,14  |
|         | REC/REF | 7  | 77,31 | 24,82 | 85,02   | 27,90  | 98,90  |
| NKG2D   | DE NOVO | 10 | 86,12 | 9,62  | 88,40   | 70,04  | 97,10  |
|         | REC/REF | 7  | 98,01 | 2,42  | 98,80   | 92,96  | 99,90  |
| NKp44   | DENOVO  | 10 | 74,45 | 10,03 | 75,91   | 57,02  | 86,60  |
|         | REC/REF | 7  | 85,10 | 13,17 | 91,74   | 61,36  | 98,40  |
| NKp46   | DE NOVO | 7  | 83,83 | 8,69  | 82,63   | 69,03  | 97,34  |
|         | REC/REF | 4  | 96,11 | 3,11  | 96,67   | 92,40  | 98,70  |
| NKp30   | DE NOVO | 10 | 86,29 | 9,11  | 86,16   | 66,55  | 98,20  |
|         | REC/REF | 7  | 95,72 | 4,26  | 98,20   | 88,47  | 99,40  |
| DNAM-1  | DE NOVO | 10 | 84,20 | 9,35  | 87,13   | 63,40  | 96,67  |
|         | REC/REF | 7  | 89,52 | 6,05  | 90,00   | 81,40  | 95,52  |
| NKG2A   | DE NOVO | 10 | 81,94 | 8,62  | 84,20   | 63,00  | 91,76  |
|         | REC/REF | 7  | 92,17 | 3,28  | 91,68   | 88,50  | 98,10  |
| CXCR6   | DE NOVO | 9  | 35,77 | 15,41 | 35,15   | 16,10  | 58,45  |
|         | REC/REF | 4  | 38,11 | 10,59 | 39,78   | 25,15  | 47,71  |

Tabla Anexa 26

| RECEPTOR |        | N  | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|----------|--------|----|-------|-------|--------|--------|
| KIR2DL1  | VIVO   | 12 | 7,45  | 13,16 | 0,30   | 46,49  |
|          | EXITUS | 5  | 0,70  | 0,54  | 0,27   | 1,56   |
| KIR2DL2  | VIVO   | 12 | 10,23 | 11,27 | 0      | 35,68  |
|          | EXITUS | 5  | 3,30  | 2,36  | 1,89   | 7,50   |
| KIR3DL1  | VIVO   | 12 | 2,95  | 3,66  | 0      | 12,40  |
|          | EXITUS | 5  | 1,46  | 1,09  | 0,61   | 3,36   |
| CD25     | VIVO   | 12 | 71,28 | 25,21 | 12,80  | 97,30  |
|          | EXITUS | 5  | 64,10 | 34,21 | 24,50  | 96,97  |
| CD69     | VIVO   | 12 | 73,00 | 21,51 | 14,50  | 93,70  |
|          | EXITUS | 5  | 92,75 | 11,77 | 72,00  | 99,50  |
| KIR2DS4  | VIVO   | 12 | 74,59 | 19,05 | 27,90  | 97,14  |
|          | EXITUS | 5  | 89,71 | 9,04  | 76,43  | 98,90  |
| NKG2D    | VIVO   | 12 | 88,23 | 10,01 | 70,04  | 99,90  |
|          | EXITUS | 5  | 97,71 | 2,79  | 92,96  | 99,81  |
| NKp44    | VIVO   | 12 | 73,59 | 9,89  | 57,02  | 86,60  |
|          | EXITUS | 5  | 91,43 | 7,33  | 79,13  | 98,40  |
| NKp46    | VIVO   | 8  | 84,90 | 8,60  | 69,03  | 97,34  |
|          | EXITUS | 3  | 97,35 | 2,31  | 94,68  | 98,70  |
| NKp30    | VIVO   | 12 | 87,57 | 9,07  | 66,55  | 99,40  |
|          | EXITUS | 5  | 96,44 | 3,17  | 91,26  | 98,80  |
| DNAM-1   | VIVO   | 12 | 84,61 | 8,63  | 3,40   | 96,67  |
|          | EXITUS | 5  | 90,67 | 6,60  | 81,40  | 95,52  |
| NKG2A    | VIVO   | 12 | 83,72 | 8,88  | 63,00  | 94,70  |
|          | EXITUS | 5  | 92,00 | 3,72  | 88,50  | 98,10  |
| CXCR6    | VIVO   | 10 | 36,96 | 15,01 | 16,10  | 58,45  |
|          | EXITUS | 3  | 34,91 | 10,34 | 25,15  | 45,74  |

Tabla Anexa 27

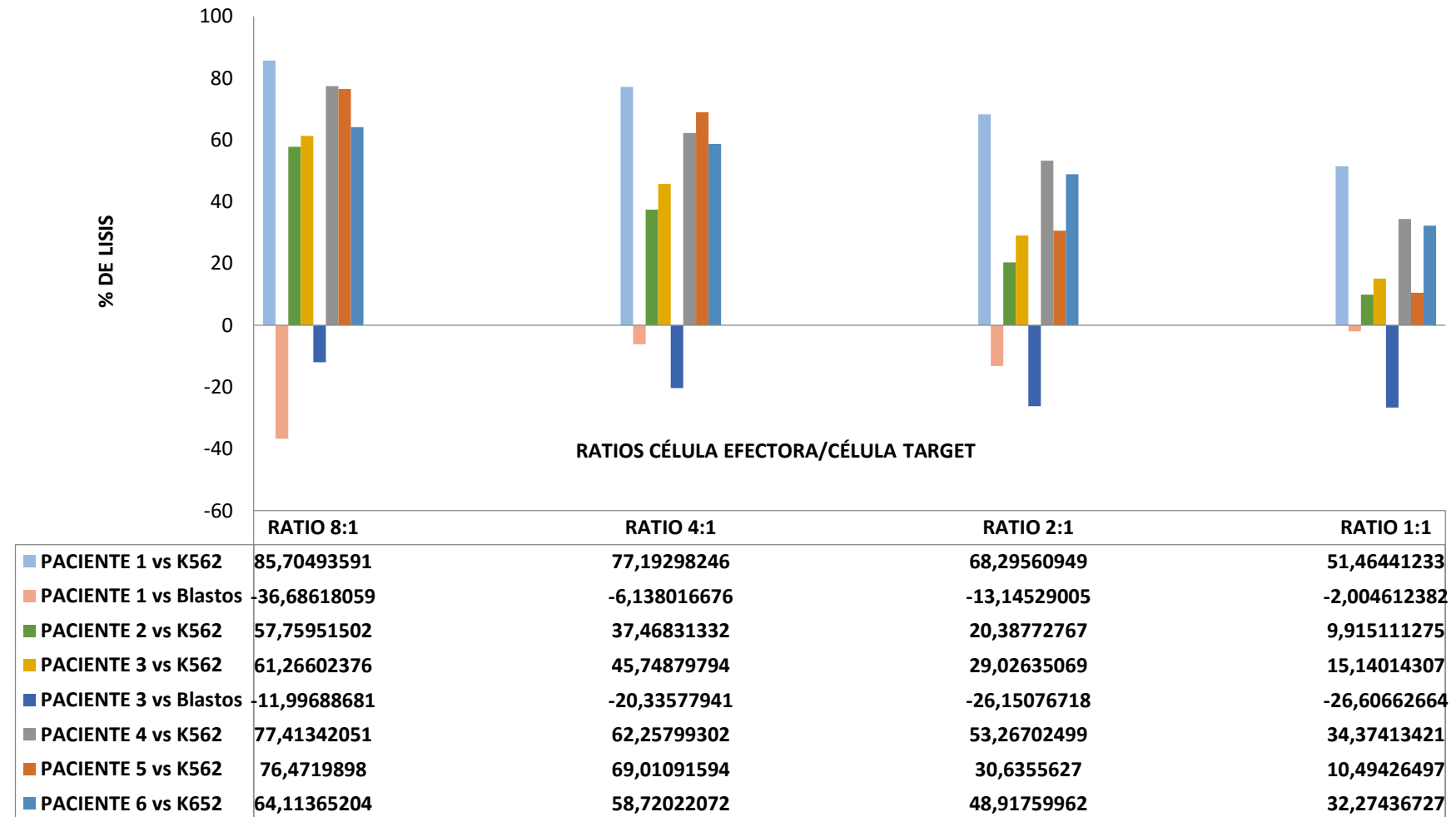
| RECEPTOR |      | N | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|----------|------|---|-------|-------|--------|--------|
| KIR2DL1  | LA   | 6 | 2,88  | 4,41  | 0      | 11,60  |
|          | SANO | 5 | 6,37  | 4,58  | 1,88   | 13,59  |
| KIR2DL2  | LA   | 6 | 5,37  | 2,31  | 1,80   | 8,00   |
|          | SANO | 5 | 4,30  | 2,73  | 2,02   | 8,84   |
| KIR3DL1  | LA   | 6 | 2,57  | 2,47  | 0      | 5,70   |
|          | SANO | 5 | 1,37  | 0,90  | 0,30   | 2,50   |
| CD25     | LA   | 7 | 6,7   | 5,04  | 1,70   | 14,20  |
|          | SANO | 5 | 15,23 | 8,02  | 7,66   | 27,88  |
| CD69     | LA   | 7 | 22,57 | 9,18  | 10,70  | 38,00  |
|          | SANO | 5 | 20,79 | 11,28 | 9,71   | 38,62  |
| KIR2DS4  | LA   | 7 | 50,73 | 12,67 | 37,50  | 76,40  |
|          | SANO | 5 | 45,21 | 5,46  | 35,77  | 49,85  |
| NKG2D    | LA   | 7 | 70,49 | 16,71 | 46,30  | 98,40  |
|          | SANO | 5 | 87,97 | 7,84  | 79,95  | 99,79  |
| NKp44    | LA   | 7 | 38,84 | 13,39 | 22,40  | 57,90  |
|          | SANO | 5 | 45,00 | 7,89  | 33,01  | 53,70  |
| NKp46    | LA   |   |       |       |        |        |
|          | SANO | 5 | 53,07 | 12,98 | 34,88  | 66,51  |
| NKp30    | LA   | 7 | 51,10 | 24,15 | 15,40  | 87,80  |
|          | SANO | 5 | 52,97 | 13,32 | 33,96  | 65,31  |
| DNAM-1   | LA   | 7 | 37,90 | 9,44  | 24,20  | 54,60  |
|          | SANO | 5 | 73,38 | 7,72  | 66,24  | 85,94  |
| NKG2A    | LA   | 7 | 65,97 | 13,74 | 41,50  | 85,40  |
|          | SANO | 5 | 68,81 | 7,97  | 57,00  | 76,34  |
| CXCR6    | LA   | 2 | 14,55 | 2,33  | 12,90  | 16,20  |
|          | SANO | 5 | 13,05 | 7,27  | 5,66   | 24,96  |

Tabla Anexa 28

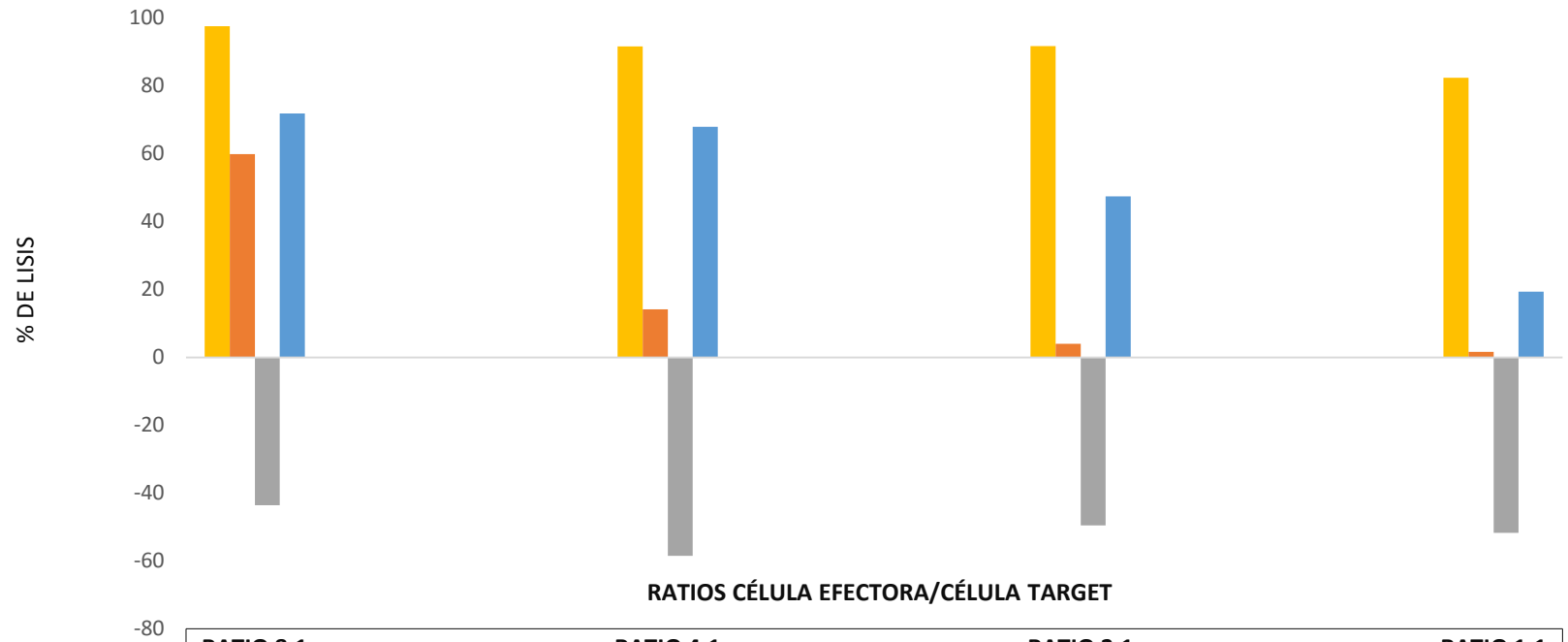
| LIGANDO |      | N  | MEDIA | SD    | MINIMO | MAXIMO |
|---------|------|----|-------|-------|--------|--------|
| KIR2DL1 | LA   | 17 | 5,46  | 11,37 | 0,27   | 46,49  |
|         | SANO | 6  | 0,56  | 0,56  | 0,19   | 1,63   |
| KIR2DL2 | LA   | 17 | 8,19  | 9,96  | 0      | 35,68  |
|         | SANO | 6  | 0,71  | 0,68  | 0,16   | 1,99   |
| KIR3DL1 | LA   | 17 | 2,51  | 3,16  | 0      | 12,40  |
|         | SANO | 6  | 0,28  | 0,55  | 0      | 1,39   |
| CD25    | LA   | 17 | 69,17 | 27,22 | 12,80  | 97,30  |
|         | SANO | 6  | 34,58 | 21,44 | 4,35   | 63,35  |
| CD69    | LA   | 17 | 78,81 | 20,95 | 14,50  | 99,50  |
|         | SANO | 6  | 80,51 | 10,47 | 62,30  | 92,16  |
| KIR2DS4 | LA   | 17 | 79,04 | 17,90 | 27,90  | 98,90  |
|         | SANO | 6  | 73,50 | 11,42 | 59,82  | 90,38  |
| NKG2D   | LA   | 17 | 91,02 | 9,52  | 70,04  | 99,90  |
|         | SANO | 6  | 94,28 | 9,11  | 75,87  | 99,22  |
| NKp44   | LA   | 17 | 78,84 | 12,29 | 57,02  | 98,40  |
|         | SANO | 6  | 57,49 | 9,02  | 47,05  | 70,46  |
| NKp46   | LA   | 11 | 88,29 | 9,31  | 69,03  | 98,70  |
|         | SANO | 6  | 83,17 | 7,30  | 72,87  | 91,01  |
| NKp30   | LA   | 17 | 90,18 | 8,74  | 66,55  | 99,40  |
|         | SANO | 6  | 80,35 | 5,69  | 70,25  | 85,50  |
| DNAM-1  | LA   | 17 | 86,39 | 8,38  | 63,40  | 96,67  |
|         | SANO | 6  | 84,67 | 11,21 | 67,83  | 95,47  |
| NKG2A   | LA   | 17 | 86,15 | 8,53  | 63,00  | 98,10  |
|         | SANO | 6  | 84,16 | 11,91 | 61,55  | 93,22  |
| CXCR6   | LA   | 13 | 36,49 | 13,70 | 16,10  | 58,45  |
|         | SANO | 6  | 23,70 | 4,30  | 17,18  | 29,12  |

Tabla Anexa 29

### CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE CÉLULAS NK DE PACIENTES CON LLA SIN RECAIDA NI REFRACTARIEDAD versus K562 Y BLASTOS AUTÓLOGOS

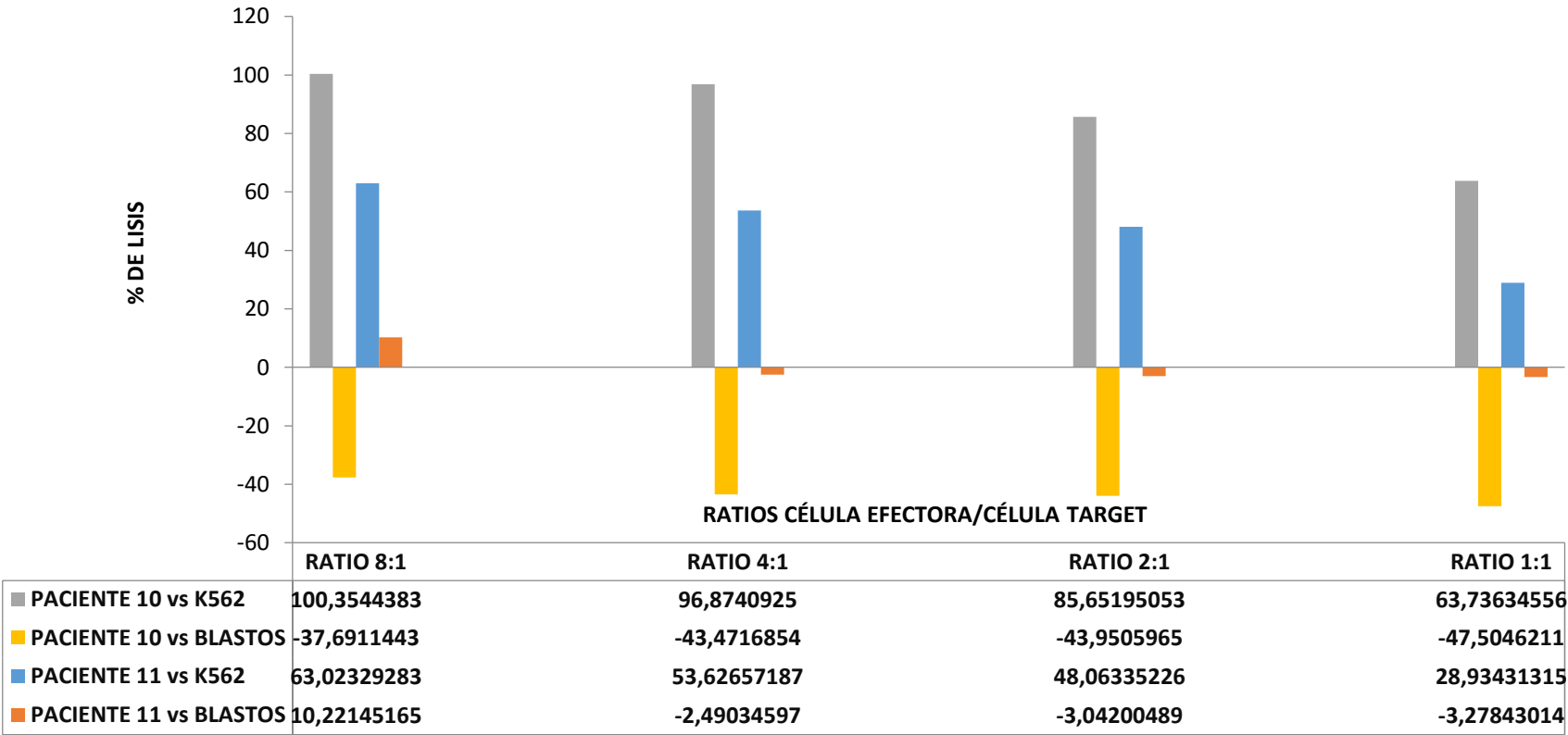


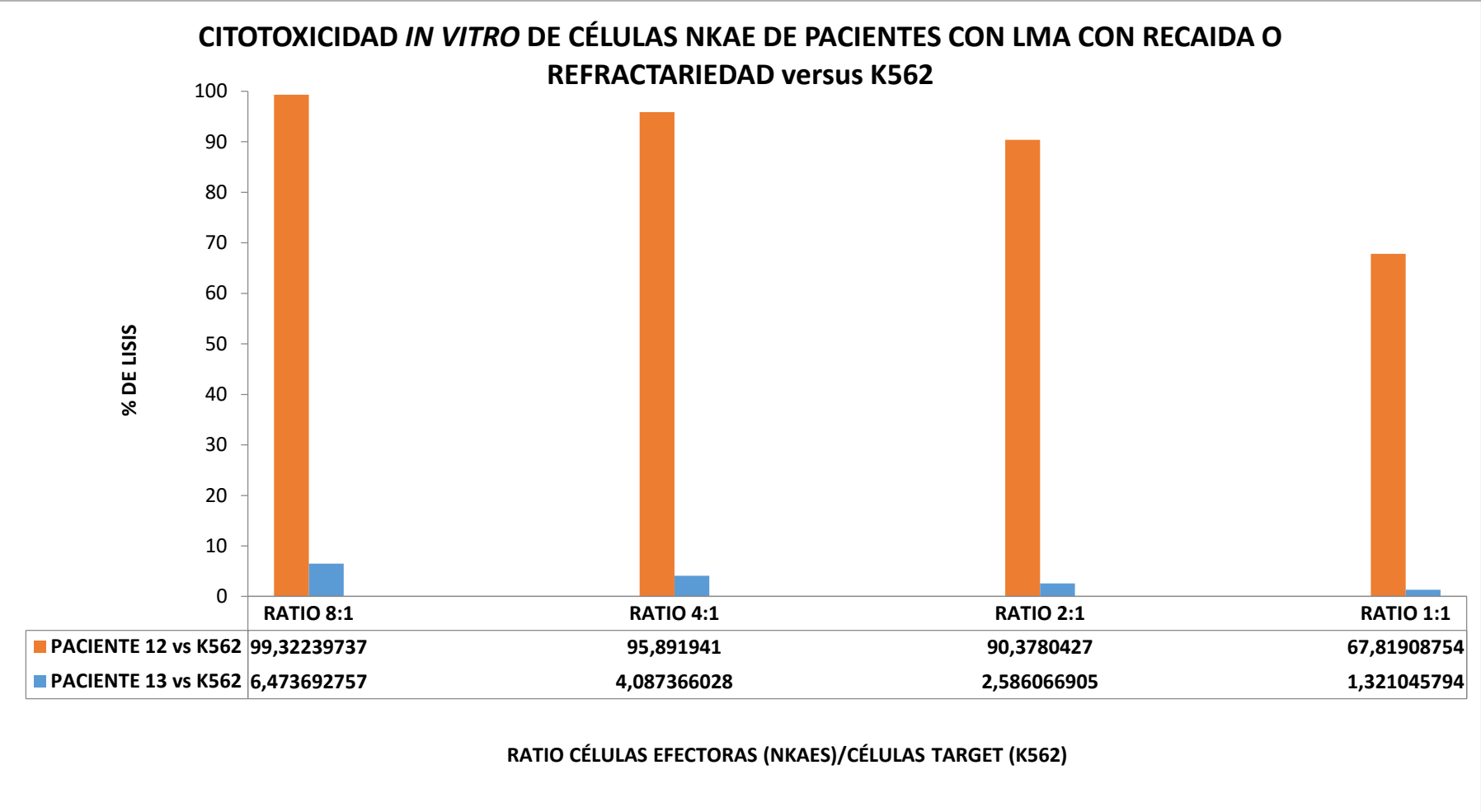
### CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE CÉLULAS NKAЕ DE PACIENTES CON LLA CON RECAÍDA O REFRACTARIEDAD versus K562 Y BLASTOS AUTÓLOGOS



|                         | RATIO 8:1    | RATIO 4:1    | RATIO 2:1   | RATIO 1:1    |
|-------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| ■ PACIENTE 7 vs K562    | 97,60009531  | 91,62974601  | 91,76005421 | 82,42030723  |
| ■ PACIENTE 8 vs K562    | 59,90451046  | 14,18080296  | 3,995589678 | 1,614420538  |
| ■ PACIENTE 8 vs BLASTOS | -43,54600052 | -58,45591435 | -49,4908173 | -51,66681173 |
| ■ PACIENTE 9 vs K562    | 71,85127722  | 67,9148889   | 47,47381836 | 19,34171885  |

**CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE CÉLULAS NKAЕ DE PACIENTES CON LMA SIN RECAIDA NI REFRACTARIEDAD versus K562 Y BLASTOS AUTOLOGOS**







| PARAMETRO                 | MARCADOR EN CITOMETRÍA DE FLUJO           |
|---------------------------|---|
| Citotoxicidad             | CD107a, GZMA, GZMB, PRF1                  |
| Secreción de citocinas    | GM-CSF, IFN-gamma, IL-10, IL-13, TNF-alfa |
| Secreción de quimioquinas | CCL3, CCL4, CCL5, XCL1                    |
| Activación                | CD25, CD69, GZMB, KLRC2, NCR2             |
| Maduración                | CD56, CD57, KIR, KLRC1, SELL              |
| Receptores activadores    | CD16, CD226, CD244, KLRK1, NCRs, KIR-S    |
| Receptores inhibidores    | KIR-L, LILRB1                             |

Tabla Anexa 31

## **Anexo 32. LISTADO DE ABREVIATURAS**

APC: célula presentadora de antígenos

CCMA: citotoxicidad celular mediada por anticuerpos

CD: Célula dendrítica

DAMP: damaged associated molecular pattern

EICH: enfermedad injerto contra huésped

FNT: factor de necrosis tumoral

GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas

HLA: human leukocyte antigen

IcL: Injerto contra leucemia

IFM: intensidad de fluorescencia media

IFN: interferón

IL: interleuquina

ILD: infusión de linfocitos del donante

KIR: killer cell immunoglobulin-like receptor

LH: Linfoma Hodgkin

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

LLC: Leucemia linfática crónica

LMA: Leucemia Mieloide aguda

LMC: Leucemia Mieloide crónica

LB: linfocito B

LT: linfocito T

MIC: MHC class I related chain

MM: Mieloma múltiple

MN: mononucleares

MO: médula ósea

NCR: receptor de citotoxicidad natural

Necl: nectin like

NK: natural killer

NKAE: natural killer expandida y activada

NKP: natural killer precursora

RI: reconstitución inmune

SLE: supervivencia libre de eventos

SMD: Síndrome mielodisplásico

SP: sangre periférica

TPH: Transplante de progenitores hematopoyéticos

ULBP: UL-16 binding protein

## RESUMEN TESIS DOCTORAL

El sistema inmune tiene un papel crucial en el origen y control posterior de la leucemia aguda (LA) infantil. El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se propuso inicialmente como tratamiento en los pacientes con LA que no respondían de forma adecuada a las terapias convencionales. La idea original era poder dar dosis mucho más elevadas de quimioterapia, algo no factible si no se poseían unos progenitores que permitieran rescatar posteriormente al paciente de la aplasia irreversible producida por esos fármacos a altas dosis. No obstante, posteriormente se fue descubriendo como el propio TPH en sí poseía un papel terapéutico, mediado por las células del inóculo en lo que se denomina efecto injerto contra leucemia (IcL). A partir de ese momento se ha ido profundizando en el estudio de los distintos grupos celulares originados en la reconstitución inmune que intervienen de una manera u otra en el periodo post-TPH, entre las cuales encontramos a las células *Natural Killer* (NK).

La capacidad antitumoral de estas células se estudió inicialmente en el TPH HLA no idéntico, en concreto en el de donante haploidéntico. En este escenario se ha constatado como un mayor grado de disparidad entre los ligandos inhibidores de las células NK y sus receptores inhibidores KIR entre donante y receptor puede potenciar la actividad frente a las células leucémicas de estas células NK que surgen en la reconstitución inmune post-TPH. Sin embargo, pocos datos y contradictorios existen en el escenario de identidad HLA.

El objetivo de esta tesis ha sido el estudio de la capacidad antitumoral de este subtipo de linfocito en el escenario de identidad HLA en pacientes con LA. Por un lado se ha querido investigar en los pacientes con LA que reciben un TPH con identidad HLA si la variabilidad en los genes KIR y todos los procesos de interacción celular que modulan y otorgan plena capacidad funcional a estas células podrían ayudarnos a optimizar la elección de donante en este tipo de TPH. En esta parte del estudio se han incluido pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda que han recibido un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) familiar HLA idéntico en un hospital terciario de Madrid entre los años 2004-2014, siendo 40 el número total de pacientes incluidos. Por otro lado, en los pacientes con LA que no reciben un TPH, se ha estudiado si las características genotípicas, fenotípicas y funcionales de estas células NK podrían proporcionarnos nuevos biomarcadores. Para ello se han incluido 23 pacientes pediátricos con LA de *novo* o en recaída diagnosticados en dos hospitales terciarios de Madrid entre los años 2012-2014.

Los resultados obtenidos de nuestra investigación nos permiten concluir en primer lugar que el genotipo KIR B en el donante conlleva un peor resultado en el seno del TPH alogénico HLA idéntico y la causa más probable es debido a su expansión competitiva, que limita el desarrollo

de linfocitos T antileucémicos en la reconstitución inmune post-TPH. EN segundo lugar se ha visto como un fenotipo más activador e inmaduro de la célula NK se asocia a una peor evolución del paciente con leucemia aguda no trasplantado. Ello podría deberse a la hipofunción que conlleva el estímulo activador de forma mantenida en la célula NK (*Disarming model*). Por último se ha objetivado como las células NK de los pacientes con leucemias agudas experimentan un cambio en su fenotipo y capacidad citotóxica frente a líneas celulares comerciales tras un proceso de expansión *in vitro*, sin haber podido demostrar un aumento de la citotoxicidad frente a las células propias de su enfermedad (de forma autóloga en cada caso). Esto posiblemente se explica por la presencia de factores solubles y en la superficie de las células leucémicas capaces de inhibir la citotoxicidad de las células NK.